

**AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**Termesztett növények abiotikus stresszfolyamatai és egyes  
védekező mechanizmusai, különös tekintettel az antioxidáns  
rendszerekre**

**JANDA TIBOR**

**MTA MEZŐGAZDASÁGI KUTATÓINTÉZETE**

**MARTONVÁSÁR**

**2007**

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke</b>	4
<b>1. Bevezetés és kutatási célok</b>	5
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	7
<b>2.1. A növényi stresszfolyamatokról általában</b>	7
2.1.1. Az alacsony hőmérséklet hatásai	7
2.1.1.1. Az alacsony hőmérséklet hatásai hidegérzékeny növényekre	8
2.1.1.2. Az alacsony hőmérsékleti edződési folyamat	11
<b>2.2. Az oxidatív stressz</b>	14
2.2.1. A reaktív oxigénformák típusai	14
2.2.2. Antioxidáns védekezőrendszerek	15
2.2.2.1. Szuperoxid-dizmutázok	15
2.2.2.2. A víz-víz ciklus	16
2.2.2.3. Az aszkorbát-glutation ciklus	16
2.2.2.4. Aszkorbát-peroxidázok	16
2.2.2.5. Glutation-reduktázok	17
2.2.2.6. Katalázok	18
2.2.3. A reaktív oxigénformák jelátviteli szerepe	19
<b>2.3. A szalicilsav élettani szerepe</b>	20
2.3.1. A szalicilsav szerepe biotikus stresszek során	23
2.3.2. A szalicilsav szerepe oxidatív stressz során	25
2.3.3. A szalicilsav lipidperoxidációt kiváltó hatása	26
2.3.4. A szalicilsav szerepe abiotikus stresszfolyamatok során	28
2.3.4.1. Toxikus fémek	28
2.3.4.2. Hőstressz	29
2.3.4.3. Szárazság és sóstressz	30
2.3.4.4. A szalicilsav szerepe alacsony hőmérsékleti stressz során	31
<b>2.4. A termolumineszcencia</b>	31
<b>3. Anyagok és módszerek</b>	34
<b>3.1. Növényi anyagok</b>	34
<b>3.2. Az ionkiáramlás mérése</b>	35
<b>3.3. A klorofill-a fluoreszcencia indukció mérése</b>	35
<b>3.4. Termolumineszcencia-mérések</b>	36
<b>3.5. P700-mérések</b>	36

<b>3.6. Enzimaktivitások meghatározása</b>	36
3.6.1. Enzimkivonás	36
3.6.2. Kataláz	37
3.6.3. Gvajakol-peroxidáz	37
3.6.4. Aszkorbát-peroxidáz	37
3.6.5. Glutation-reduktáz	38
3.6.6. Glutation-S-transzferáz	38
3.6.7. Szuperoxid-dizmutáz	38
3.6.8. Peroxidáz izoenzimek kimutatása gélelektroforézissel	38
<b>3.7. Fehérjetartalom-meghatározás</b>	39
<b>3.8. Lipidanalízis</b>	39
<b>3.9. Szalicilsavtartalom-meghatározás</b>	39
<b>3.10. A LeAPx1 gén térképezése</b>	39
<b>3.11. Statisztikai kiértékelés</b>	40
<b>4. Eredmények</b>	41
<b>4.1. Szalicilsav és származékainak hatása fiatal kukoricanövények stresszélettani paramétereire</b>	41
4.1.1. Szalicilsav egyes rokon vegyületeinek hatása fiatal kukoricanövények hidegtűrő-képességére	41
4.1.2. Szalicilsav és rokon vegyületeinek katalázgátló hatásának vizsgálata in vitro	43
4.1.3. Szalicilsav és származékainak hatása fiatal kukoricanövények egyes fotoszintetikus paramétereire és növekedésére	44
<b>4.2. Termolumineszcencia alkalmazása egyes abiotikus stresszfaktorok hatásainak kimutatásában</b>	47
4.2.1. Fagystressz	47
4.2.1.1. Kukorica	48
4.2.1.2. Borsó	50
4.2.1.3. Futómuskátli	50
4.2.1.4. Uborka és tök	51
4.2.1.5. Az AG-sávnak a flash-indukálta TL görbében való részvételének további igazolása	52
4.2.1.6. Fagyasztás hatásának vizsgálata klorofill-a fluoreszcencia indukcióval	54
4.2.2. Szárazság és hőstressz	56
4.2.3. Alacsony hőmérsékleti stressz (chilling) detektálása kukoricában termolumineszcenciával	58

4.2.4. Mutáns és transzgenikus növények abiotikus stressztűrő képességének vizsgálata termolumineszcenciával	61
<b>4.3. Az antioxidáns enzimrendszer szerepe a gabonafélék alacsony hőmérsékleti adaptációjában</b>	63
4.3.1. Gabonafélék fagyállósága és antioxidáns aktivitása közti kapcsolat vizsgálata	63
4.3.2. Alacsony hőmérsékleti stressz hatása kukoricanövények antioxidáns működésére	68
4.3.2.1. Fiatal kukoricanövények hidegtűrésének jellemzése klorofill-a fluoreszcencia indukcióval	68
4.3.2.2. Fiatal beltenyésztett kukoricavonalak és hibridek antioxidáns működése	69
4.3.3. Környezeti tényezők hatása gabonafélék fagyállóságának kialakulásában	72
4.3.3.1. Klorofill-a fluoreszcencia indukció	73
4.3.3.2. Termolumineszcencia mérések	74
4.3.3.3. P700 mérések	75
4.3.3.4. A megvilágítás hatása az alacsony hőmérsékleti edzés során bekövetkező zsírsavösszetétel-változásra őszi bűzaban	76
4.3.3.5. Az edzés alatti megvilágítás hatása őszi bűza antioxidáns aktivitására	77
4.3.3.6. A hidegedzés és a megvilágítás hatása az őszi bűza szalicilsav metabolizmusára	78
4.3.4. Szárazság és gombafertőzés együttes hatása bűzanövények antioxidáns aktivitására	80
<b>4.4. Az aszkorbát-peroxidáz molekuláris genetikai vizsgálata paradicsomban</b>	82
<b>5. Az eredmények megvitatása</b>	83
5.1. Szalicilsavsármazékok stressztűrést fokozó hatásainak vizsgálata	83
5.1.1. A szalicilsav hatásmechanizmusa	88
5.2. Az AG TL sáv változása mint a különböző stresszfaktorok indikátora	91
5.3. Az antioxidáns enzimek szerepe gazdasági növények abiotikus stressztoleranciájában	94
5.3.1. A fény szerepe gabonafélék fagyállóságának kialakításában	98
5.4. Az eredmények gyakorlati alkalmazásának lehetőségei	104
<b>6. Összefoglalás</b>	105
<b>7. Új tudományos eredmények és következtetések</b>	111
<b>8. Hivatkozások</b>	112
<b>Köszönetnyilvánítás</b>	130

## Rövidítések jegyzéke

AG	Afterglow
APX	Aszkorbát-peroxidáz
BA	Benzoésav
CS	Chinese Spring
CS/Ch 5A	Chinese Spring/ Cheyenne 5A kromoszóma-szubsztitúciós vonal
CS/Ch 5D	Chinese Spring/ Cheyenne 5D kromoszóma-szubsztitúciós vonal
CBF	C-repeat binding factor
DBI	Kettőskötés-index
DGDG	Digalaktoszil-diacil-glicerid
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoésav)
DTR	<i>Drechslera tritici-repentis</i>
EDTA	Etilén-diamin-tetraacetát
F <sub>m</sub>	Maximális fluoreszcencia sötétadaptált állapotban
F' <sub>m</sub>	Maximális fluoreszcencia fényadaptált állapotban
F <sub>o</sub>	Kezdeti fluoreszcencia sötétadaptált állapotban
F <sub>s</sub>	Steady state fluoreszcencia
F <sub>v</sub>	Változó fluoreszcencia sötétadaptált állapotban
FR	Távoli vörös
GC/MS	Tömegspektrométerrel felszerelt gázkromatográf
GR	Glutation-reduktáz
GSH	Redukált glutation
GSSG	Oxidált glutation
GST	Glutation-S-transzferáz
MGDG	Monogalaktoszil-diacil-glicerid
HOS	High induction of osmotically responsive elements
LAR	Local acquired resistance
LHC	Fénygyűjtő komplex
NBT	Nitro-blue-tetrazolium
oHCA	o-hidroxifahéjsav
PAL	Fenilalanin-ammónia-liáz
PCR	Polimeráz láncreakció
PE	Foszfatidil-etanolamin
PPFD	Fotoszintetikusan aktív fotonfluxus denzitás
PEG	Polietilén-glikol
PG	Foszfatidil-glicerin
POD	Gvajakol-peroxidáz
PR	Pathogenesis related
PS1	Első fotokémiai rendszer
PS2	Második fotokémiai rendszer
Q <sub>A</sub>	Elsődleges kinon akceptor
Q <sub>B</sub>	Másodlagos kinon akceptor
q <sub>N</sub>	Nem-fotokémiai kioltás
q <sub>P</sub>	Fotokémiai kioltás
SA	Szalicilsav
SAR	Systemic acquired resistance
SOD	Szuperoxid-dizmutáz
TL	Termolumineszcencia

## 1. Bevezetés és kutatási célok

Ritkán múlik el olyan év hazánkban, hogy a szélsőséges kontinentális éghajlatból eredően ne kelljen valamilyen súlyos gazdasági következményekkel járó káros környezeti tényezővel számolni. Hol egy hosszantartó, súlyos aszály, hol a rossz időben, rossz helyen lezúduló túlzott csapadékmennyiségből eredő belvíz, hol a túlságosan kemény tél, vagy túl meleg nyár, esetleg valamilyen kártevő hirtelen megjelenéséből adódó járvány teheti tönkre az adott év, vagy akár egy évtized munkáját.

A növénynemesítőknek és a termesztőknek egyaránt az az érdekük, hogy olyan növényekkel dolgozhassanak, melyek a környezet változásait a lehető legkisebb mértékű károsodás mellett tolerálják. Ahhoz, hogy ilyen növényeket elő lehessen állítani, mindenekelőtt a növények egyes védekező és szabályozási folyamatait kell megismerni.

A biológiai értelemben vett stressz fogalmának bevezetése, valamint az alapjaiban máig elfogadott stresszelmélet megalkotása a magyar származású Selye János (1907-1982) nevéhez fűződik. Definíciója szerint „a stressz egy fajlagos tünetcsoportban megnyilvánuló állapot, mely magába foglal minden nem-fajlagosan előidézett változást egy biológiai rendszeren belül” (Selye, 1936; 1978). Megfigyelései szerint a szervezet számos olyan reakciót mutat, mely függetlenül a stresszt kiváltó stresszor fajtájától, minden esetben lényegében hasonló tüneteket produkál. Ez vezetett az ún. általános adaptációs szindróma elméletének kidolgozásához. Eszerint a szervezetben egy stresszor megjelenését követően a szervezetben három stádium figyelhető meg: az első az alarm, vagy készültségi reakció, amikor az alkalmazkodási készség a normális szint alá kerül. Ha viszont nem következik be súlyos akut károsodás, a szervezet mozgósítja tartalékait, és az edződés révén kialakul a rezisztencia állapota. Ha a stresszor túl hosszán és intenzíven jelen van, a szervezet kimerül, mely akár pusztuláshoz is vezethet. Bár Selye orvosként elsősorban humán és állati rendszereket tanulmányozott, elmélete általános vonatkozásai növényi rendszerekre is alkalmazhatóak (Larcher, 1995).

Különösen trópusi és szubtrópusi eredetű növényeink már 10-12 °C alatt jelentős károsodást szenvedhetnek. A hazánkban és a világ számos más országában egyaránt az egyik legfontosabb gazdasági növény, a kukorica esetében a hideg károsító hatásával elsősorban a növény fejlődésének kezdeti szakaszában kell számolni. A károsodás minőségét és mértékét a külső körülmények (a hideghatás időtartama, a fényerősség, a talaj nedvességtartalma, a levegő páratartalma, stb.) jelentősen befolyásolhatják. Régi megfigyelés, hogy ha a növényt

több fény éri, mint amit a fotoszintézisben fel képes használni, vagy valamilyen szabályzó mechanizmus útján közömbösíteni tud, a fotoszintetizáló képesség lecsökken. A jelenséget fénygátlásnak, más szóval fotoinhibíciónak hívjuk. Kiderült, hogy különböző egyéb stresszhatások, mint például a hidegstressz is, a fénygátlás mértékét felerősíthetik. Másrésztől tekinthetjük mindezt fordítva is: előfordulhat, hogy egy olyan stresszhatás, mely sötétben kevésbé viseli meg a növényt, fényben végzetes lehet.

Mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagy jelentősége van azon anyagok vizsgálatának, melyek a gazdasági növények stresszérzékenységét csökkenteni képesek. Már jóideje ismert, hogy a szalicilsav szerepet játszik egyes patogének elleni védekezési folyamatokban. Az abiotikus stresszek vonatkozásában mi mutattuk ki elsőként, hogy védelmet nyújthat alacsony hőmérsékleti stressz során is (Janda és mtsai., 1997, 1999a; Szalai, 1997a). A dolgozatban leírt munka egyik fő célja nemcsak a szalicilsav, hanem egyes rokon vegyületek, elsősorban a szalicilsav szintézisében szerepet játszó prekursorok lehetséges stresszélettani szerepének felderítése volt. Ezáltal közelebb juthatunk a szalicilsavhoz kötődő szabályozási mechanizmusok jobb megismeréséhez.

Különösen a hidegtűrő növényeknél az alacsony hőmérsékletnek jótékony hatásai is vannak. Őszi búzafajtáknál például a megfelelő idejű és megfelelő hőmérsékletű hidegkezelés mind a vernalizációnak, mind pedig a fagy- ill. télállóság kialakulásának elengedhetetlen feltétele. Jelen munka további fontos célja egyrészt annak kiderítése, hogy milyen kapcsolat van egyes gabonafélék fagyállósága és antioxidáns aktivitása között, másrészt arra a kérdésre kerestünk választ, hogy milyen folyamatok vesznek részt a fagyállóság kialakulásának szabályozásában.

*A fentiek alapján a következő fő feladatokat tűztük ki:*

1. Szalicilsavval rokon vegyületek kukorica hidegtűrésének befolyásoló hatásának vizsgálata.
2. Szalicilsav és rokon vegyületeinek hatásmechanizmusának felderítése.
3. Különböző abiotikus stresszfaktorok hatásának vizsgálata termolumineszcenciával.
4. Gabonafélék fagyállósága és antioxidáns enzimeinek aktivitása közti kapcsolat felderítése.
5. A fény szerepének tanulmányozása a gabonafélék alacsony hőmérsékleti edzése során.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A növényi stresszfolyamatokról általában

Tekintettel arra, hogy jelen munka döntő többsége az alacsony hőmérsékleti stresszfolyamatokhoz kötődik, a következőkben elsősorban az ezzel kapcsolatos legfontosabb ismereteket tekintjük át.

#### 2.1.1. Az alacsony hőmérséklet hatásai

Míg egyes stresszfaktorok (pl. herbicidek, fénygátlás, stb.) többé-kevésbé jól meghatározható elsődleges hatóhellyel rendelkeznek, addig a hidegstressz az anyagcsere valamennyi működését befolyásolja. Ez nem meglepő, hiszen minden biokémiai folyamatnak a sebessége hőmérsékletfüggő, minden enzim meghatározott hőmérsékleti optimummal rendelkezik. Az optimálistól eltérő hőmérsékleten egyrészt a szubsztrátmolekulák csökkent diffúziója révén, másrészt az enzimek alacsonyabb aktivitása miatt megváltozik az enzimátikus folyamatok sebessége. Az egyes anyagcserefolyamatok eltérő mértékben reagálnak a hideghatásra, a sejt metabolikus egyensúlya felborul. Egyes folyamatok esetében az alacsony hőmérséklet hatása csak a hidegstressz alatt jelentkezik, majd miután a növény optimális hőmérsékletre kerül vissza, a funkció helyreáll. Ezzel szemben más folyamatok tartósan károsodhatnak a stressz következtében, így a csökkent működés a hideghatás megszűnése után is kimutatható. Bizonyos esetekben a hidegstressz látható jelei alacsony hőmérsékleten nem, csak azt követően, normál hőmérsékleten jelentkeznek (*post-chilling* tünetek).

A trópusi, szubtrópusi eredetű fajok jelentős hidegérzékenységgel bírnak, és szélsőséges esetben már rövid hideghatás után sem képesek regenerálódni. A mérsékeltövi növények nagy részében azonban olyan akklimatizációs (edződési) folyamatok mennek végbe a hideg hatására, melyek lehetővé teszik az anyagcsere fenntartását és biztosítják a növény ellenállóságát az alacsony hőmérséklettel szemben. A télálló növényeknél ez az akklimatizációs folyamat még a fagypont alatti hőmérséklet túlélésére is képessé teszi a növényt. Egyes növényfajoknál nemcsak a fagyállóságot biztosítja a hideghatás, hanem a virágzás indukciójához is szükséges (vernalizáció). Fontos hangsúlyozni, hogy a fent említett három fontos hatás, azaz a degradáció, az edződés, valamint a vernalizáció sok esetben



párhuzamosan zajlik, emiatt a kutatók számára az egyik nagy kihívás ezen folyamatok határozott elkülönítése.

#### 2.1.1.1. Az alacsony hőmérséklet hatásai hidegérzékeny növényekre

Az alacsony hőmérséklet hatásait növényekben - főként a hőmérséklettől és időtartamtól függően - többféle aspektusból vizsgálják. Például a fiatal kukoricanövények fejlődéséhez, egyéb környezeti tényezőktől és genotípustól függően, 20 - 27 °C tekinthető optimálisnak. A 15 - 20 °C-os hőmérsékleti intervallum az ún. szuboptimális tartomány, melyen a növények még megfelelő mértékben fejlődhetnek. Amennyiben a növények 12 - 15 °C-os hőmérséklettartományban növekednek, kismértékű edződés is megfigyelhető (Janda és mtsai., 1998). Ez alatti hőmérséklettartományban azonban már egyre inkább a károsodás tünetei mutatkoznak (*chilling*). 5 - 7 °C alatt ezek a növények már gyakorlatilag nem növekednek, sőt egy bizonyos idő után el is pusztulnak. A különböző eredetű növényfajok az alacsony, fagypont feletti hőmérsékletre eltérő érzékenységet mutatnak. Ugyanakkor egy növényen belül is tapasztalhatunk különbségeket az egyes szövetek, sejttípusok hidegérzékenységében. A növény stressztűrő képességét az adott szövet, vagy szerv kora is befolyásolhatja. Mindemellett az is ismert, hogy például a kukorica mezofillsejtek érzékenyebbek a hideg károsító hatására, mint a hüvelyparenchima sejtek (Kratsch és Wise, 2000).

A növény anyagcseréjének számos folyamata membránhoz kötött. Éppen ezért többen feltételezik, hogy a hideghatás alatt a membránokban lejátszódó folyamatoknak kulcsszerepük van mind a hidegkárosodás kialakulásában, mind pedig az alacsony hőmérséklethez történő alkalmazkodásban (Lyons és Raison, 1970; Lyons, 1973; Lyons és mtsai., 1979; Murata és mtsai., 1983). A membrán lipid fázisátmenet hipotézis hosszú ideig egyféle magyarázatot adott a hideg okozta károsodásokra (Lyons, 1973). E szerint az elmélet szerint a membránlipidek valószínűleg folyadék kristályos állapotban vannak, hogy el tudják látni a szemipermeábilis gát szerepét a sejtkompartmentek között, és megfelelő környezetet biztosítsanak az *intrinsic* membránproteineknek. Hidegérzékeny növényeknél egy kritikus hőmérsékleten a membránlipidek egy gélszerű állapotba mennek át, s ez zavart okoz a membránok működésében. Újabb eredmények azt mutatják, hogy a fázisátmenet hipotézis eredeti formájában arra alkalmas, hogy megmagyarázza a termofil cianobaktériumok membránjának működési zavarait *chilling* hatására (Murata, 1989), de magasabbrendű növényeknél ez eléggé kétséges (Martin, 1987). Manapság az elfogadott álláspont, hogy az

alacsony hőmérsékletre érzékeny növények hidegkárosodásánál a membránlipidek nagy részénél nem történik fázisátmenet, bár előfordulhat, hogy kisebb lipidfrakciók lokálisan fázisátalakulást szenvedhetnek alacsony hőmérsékleten (Quinn, 1988). A membránösszetétel különbségei részben megmagyarázhatják a hidegérzékenységben tapasztalt különbségeket. Ennek közvetlen bizonyítéka az, hogy akár a hidegérzékeny *Anacystis nidulans* kéalgába, vagy egyes magasabbrendű növényekbe egy a lipidek telítetlenségéért felelős gén (az ún. *desA* gén) bevitele a hidegtűrést jelentősen megnövelte (Wada és mtsai., 1990; Ishizaki-Nishizawa és mtsai., 1996).

Hideghatás szempontjából a fotoszintetikus apparátus a növény egyik legérzékenyebb pontja. Hidegstressz hatására a leveleken klorotikus foltok jelennek meg, melynek oka, hogy alacsony hőmérsékleten gátolt a klorofill molekulák bioszintézise, az etioplasztiszok és kloroplasztiszok fejlődése (Berry és Björkman, 1980; Yoshida és mtsai., 1996; Böddi és mtsai., 1997).

A fénygátlás (fotoinhibíció) jelensége, melynek során a magas fényintenzitásnak kitett növény fotoszintetizáló képessége károsodik (Vass és mtsai., 1992), alacsony hőmérséklet hatására már viszonylag alacsony fényintenzitáson is felléphet. Korábbi vizsgálataink során kimutattuk, hogy a PS2 maximális kvantumhatékonyságát jelző  $F_v/F_m$  paraméter sötétben, 5°C-on még 2 nap után sem utalt a kukorica növények fotoszintetikus rendszerének károsodására, fényen viszont már pár óra hideghatás után lecsökkent (Janda és mtsai., 1994a; Szalai és mtsai., 1996). Kimutattuk továbbá, hogy az alacsony hőmérséklet által indukált fotoinhibíció nemcsak a fotoszintetikus folyamatok, hanem egyéb stresszmarkerek, úgymint szabad aminosavak és poliaminok szintjén is megnyilvánul (Szalai és mtsai., 1997b). A fénygátlás során fokozott mértékben képződnek reaktív oxigénformák. Ennek következtében felborul az egyensúly az elnyelt és a felhasznált energia között, az elektrontranszportlánc túlgerjesztett állapotba kerül. A felborult egyensúly oka egyrészt a Calvin-ciklus enzimeinek nem megfelelő mértékű aktivitása, illetve a zárt gázcserenyílások következtében kialakuló kisebb intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció. Az elektronok a fotoszintetikus elektrontranszportláncról az O<sub>2</sub> molekulákra juthatnak, és szuperoxidgyökök keletkezhetnek. A PS2-ben kétszeresen redukált és/vagy protonált Q<sub>A</sub> keletkezik, ami elhagyhatja a kötőhelyét. A P680 triplet állapotba (<sup>3</sup>P680\*) kerül, ami szinglet oxigén képződéséhez vezethet, amely károsítja a PS2-t, és elősegíti a D1 fehérje lebomlását is (Vass és mtsai., 1992). A fénygátlás károsító hatásainak kiküszöbölésére különböző mechanizmusok léteznek (Aroca és mtsai., 2001). Egyrészt a reaktív oxigénformák keletkezésének megelőzése a fotoszintetikus elektrontranszport lánc, illetve a PS2 antennarendszerének csökkentésével, másrészt az energiafelesleg disszipációja

hő formájában a violaxantin dezepoxidációja által. Ugyancsak az energiafelesleg elvezetését szolgálja a kloroplasztisban az ún. víz-víz ciklus. Ennek során a PS2-ből a vízmolekuláról származó elektronok a PS1-ben az O<sub>2</sub> redukciójára fordítódnak, így gyakorlatilag az O<sub>2</sub> mennyiségében nem történik változás (Asada, 1999). A ciklus működtetésében antioxidáns enzimek is részt vesznek, úgymint a szuperoxid-dizmutáz (SOD), az aszkorbát-peroxidáz (APX), és a glutation-reduktáz (GR). A fénygátlás károsító hatását csökkenti továbbá a keletkezett reaktív oxigénszármazékok közömbösítése antioxidáns vegyületek és enzimek segítségével (Aroca és mtsai., 2001).

Tekintettel arra, hogy az alacsony hőmérséklet károsító hatásának egyik fő oka a reaktív oxigénformák felhalmozódása (Prasad és mtsai., 1994a), az antioxidáns rendszer válasza különleges fontosságú a hidegstressz elleni védelemben (az oxidatív stresszel kapcsolatosan ld. a 2.2 fejezetet). Egyes szerzők szerint a különböző kukorica genotípusok eltérő hidegérzékenységeinek hátterében részben az antioxidáns rendszer eltérő működése áll (Prasad és mtsai., 1994a). Kukorica levelekben a legtöbb antioxidáns enzim, úgymint SOD, APX, gvajakol-peroxidáz (POD) és GR, aktivitásának növekedéséről számoltak be, egyedül a kataláz aktivitásában mutattak ki csökkenést (Lee és Lee, 2000). A kukoricalevelek kétféle sejttípusának fentebb említett eltérő hidegérzékenysége mögött is, legalábbis részben, az eltérő oxidatív hatás áll. A hüvelyparenchima sejtek kloroplasztisából hiányzik a PS2, az O<sub>2</sub> termelés csak kis mértékű, így szuperoxidgyök keletkezésének is kisebb az esélye. A mezofill sejtekben nagyobb hidrogén-peroxid koncentrációt mutattak ki (Doullis és mtsai., 1997). Ugyancsak eltérés mutatkozik a két szövet között az antioxidánsok eloszlásában. A NADPH szintézis a mezofill sejtekre jellemző, így a GR jelenléte is erre a sejttípusra korlátozódik, ugyanakkor az APX főként a hüvelyparenchima sejtekben található. Kataláz mindkét sejttípusban jelen van, de a mezofill sejtekre inkább a kataláz1 és kataláz3 jellemző, a hüvelyparenchima-sejtekre pedig a kataláz2. Az alacsony hőmérséklet hatására még kifejezettebb az eltérés az antioxidáns enzimek eloszlásában (Pastori és mtsai., 2000). A mezofill sejtekben 15°C-on fokozódik a glutation-reduktáz aktivitása, míg katalázaktivitás változást már nem mutattak ki. A hüvelyparenchima sejtekben hideghatásra megnőtt az aszkorbát-peroxidáz aktivitás. Rizs növényekben alacsony hőmérséklet hatására szintén gyors növekedést tapasztaltak az APX és a POD aktivitásában. A SOD és a GR enzimek lassabb aktivitás-növekedést mutattak, míg a kataláz aktivitásában nem történt változás (Oidaira és mtsai., 2000).

Az alacsony hőmérsékletre való akklimatizáció kialakulása hormonális szabályozás alatt áll. Ismert, hogy alacsony hőmérsékleti kezelés során megnő az abszcizinsav mennyisége

(Janowiak és Dörffling, 1996). Különböző kukorica genotípusokban kimutatták, hogy szoros összefüggés van a hidegtolerancia és az abszcizinsav akkumuláció között (Janowiak és mtsai., 2002). Az abszcizinsavszint azonban nemcsak alacsony hőmérséklet, hanem pl. szárazság során is megnő, így az sem zárható ki, hogy a hideghatásra fellépő abszcizinsavszint-növekedés az alacsony hőmérsékleti stresszt kísérő vízhiány következménye. Mindazonáltal a kétféle stresszfaktor, a hideg és a szárazság elleni védekező folyamatok átfedésére több eredmény is utal. Kimutatták, hogy a rövid idejű szárazságstressz fokozta a kukorica (Sánchez-Díaz és mtsai., 1993) vagy a rizs (Kitagawa és Yoshizaki, 1998) hidegtűrését is. A kutatások külön ágát képezik azok a vizsgálatok, melyek olyan vegyületek keresésére irányulnak, amik segítségével a gazdasági növények stressztűrő képességét növelni lehet. Az ilyen vegyületeknél elvileg kétféle megközelítés alkalmazható: vagy az adott anyag szintézisét fokozzuk, vagy külsőleg adjuk a növénynek. Az irodalomban mindkét esetre több vizsgálati eredmény is található. Jelen esetben példaként említem, hogy az alacsony hőmérséklet károsító hatása enyhítő volt az által, ha rövid ideig tartó hidrogén-peroxid-kezelésnek tették ki a növényeket a hidegstressz előtt (Prasad és mtsai., 1994a), illetve, ha előzetesen szalicilsav-kezelést kaptak (Janda és mtsai., 1999a).

#### *2.1.1.2. Az alacsony hőmérsékleti edződési folyamat*

Amennyiben a növények tartósan fagypont alatti hőmérsékletre kerülnek, az alacsony hőmérsékleti stresszt a fagyhatás is súlyosbítja. Mindez a jégkristályok képződésének következtében együtt jár egyrészt egy extra vízelvonással, másrészt a jégkristályok által okozott közvetlen mechanikai károsodással, melynek elsősorban a membránok a fő szenvedői (Thomashow, 2001). A megfelelő mértékű télállóság kialakításához még a kiváló fagyállósággal rendelkező őszi gabonafajták esetében is fontos, hogy mielőtt jóval fagypont alatti hőmérsékletre kerülnek, meghatározott idejű alacsony, de még fagypont feletti hőmérsékleten történő edzési perióduson essenek át. A fagyűrő képesség komplex biokémiai és biofizikai folyamatok eredménye, kialakításában több folyamat is szerepet játszik. Ezen folyamatok pontos mechanizmusa azonban még csak kevéssé ismert, annak ellenére, hogy már számos hideghatásra indukálódott gén expresszióját leírták.

Az régóta ismert, hogy az alacsony hőmérsékleti edzés génexpressziós változásokkal jár együtt (Guy és mtsai., 1985). Elsősorban *Arabidopsis*-szal végzett vizsgálatok alapján jelenleg mintegy tízezres nagyságrendre tehető azon gének száma, melyek expresszióját az alacsony hőmérséklet befolyásolhatja. Tekintettel arra, hogy a hidegstressz, különös

tekintettel a fagystresszre, közvetve szárazságstresszel jár együtt, nem meglepő, hogy a növények génexpressziós mintázatát vizsgálva hideg- és szárazságkezelés után, számos olyan gént találtak, mely mindkét stresszhatásra indukálódott (Shinozaki és mtsai., 2003). Ezidáig számos, az alacsony hőmérsékleti akklimatizációs folyamat génszintű szabályozásában résztvevő faktort azonosítottak. Azok a vegyületek jelentős része, melyekről kiderült, hogy a hideghatásra adott válaszban bizonyos gének expressziójának regulációjában szerepet töltenek be, az ún. CBF (*C-repeat binding factor*) transzkripciós faktorok voltak (Stockinger és mtsai., 1997; Van Buskirk és Thomashow, 2006). Búza esetében az 5A kromoszóma jelentős szerepet tölt be a fagyállóság kialakításában (Sutka, 1981; Veisz és Sutka, 1989; Sutka, 1994). Ezen a kromoszómán számos olyan gén található, köztük CBF-ek is, melyek az alacsony hőmérsékleti stresszre adott válaszban szerepet játszanak (Dubcovsky és mtsai., 1995; Galiba és mtsai., 1995; Vágújfalvi és mtsai., 2003; 2005). A CBF-ek mellett az elmúlt években több más szabályzó faktor és regulációs mechanizmus is ismertté vált, mint pl. ZAT12 - *Arabidopsis thaliana* Zn-transzporter, vagy HOS - ozmotikus stresszre válaszoló gének fokozott kifejeződése (Vogel és mtsai., 2005; Chinnusamy és mtsai., 2006; Nakashima és Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Az alacsony hőmérséklet által befolyásolt gének jelentős részének szabályozásában kalciumtól, abszcizinsavtól, ill. reaktív oxigénformáktól függő utak jelátviteli utak is részt vesznek (Foyer és Noctor, 2005; Suzuki és Mittler, 2006).

Az akklimatizáció folyamatának fontos eleme az ozmoregulációban szerepet játszó cukrok, illetve a prolin koncentrációjának növekedése a sejtekben. A prolin nemcsak ozmolitikumként játszik szerepet, hanem, részt vesz a szabad gyökök eltávolításában is (Hong és mtsai., 2000). A szénhidrátok mennyiségének alacsony hőmérséklet hatására bekövetkező növekedését mind lúdfűben, mind búzában leírták (Strand és mtsai., 1999; Galiba és mtsai., 2005), és megállapították, hogy szoros összefüggés áll fenn a cukorkoncentráció és a fagytűrés között. A búza 5A kromoszómáján lokalizálódik egy szénhidrát-felhalmozásért felelős gén is, mely a *Vrn1* vernalizációs génnel kapcsolt, vagy azzal azonos, az *Fr1* géntől viszont elválasztható (Galiba és mtsai., 1997).

A hidegedzés során a fenilanyagcserében is változások figyelhetők meg. Hidegedzett *Brassica napus* növényekben megnőtt a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) aktivitás, az oldott fenol-származékok mennyisége, a hidroxifahéjsav- és antocianin-tartalom. A PAL aktivitás gátlása pedig csökkent fagytűrést eredményezett (Solecka és Kacperska, 2003).

Edzési hőmérsékleten a növekedés lelassul, és a fotoszintézis is kisebb sebességgel megy végbe. Azonban, különösen a fagytűró növények esetében figyelhető meg, hogy a fotoszintetikus termékek felhasználása a növekedés erős csökkenésének hatására nagyobb mértékben csökken,

mint a fotoszintézis intenzitása. Ennek következtében egyes szénhidrátféleségek felhalmozódnak, és ezzel hozzájárulhatnak az alacsony hőmérsékleti adaptációhoz (Vágújfalvi és mtsai., 1999; Galiba és mtsai., 2002; 2005). Egyes fagyűrő növények, mint például az őszi gabonák, a hidegperiódus alatt is fenntartják fotoszintetikus aktivitásukat, és eközben alakul ki maximális fagyűrésük (Huner és mtsai., 1998). A fotoszintetikus aktivitás fenntartásának feltétele többek között a fotoinhibícióval szembeni ellenállóság, melyet a növények a  $Q_A$  készlet oxidált állapotban tartásával érnek el. Ehhez a fotoszintetikus szénanyagcsere enzimeinek aktivációja is szükséges, így az akklimatizációs folyamat részeként a sejtek cukorkoncentrációja nő. A kloroplasztisz membránlipidek deszaturációja szintén a fotoszintetikus apparátus védelmét biztosíthatja az alacsony hőmérséklet indukálta fotoinhibícióval szemben, amint azt transzgenikus dohány esetén megfigyelték (Moon és mtsai., 1995).

Számos bizonyíték szól amellett, hogy alacsony hőmérsékleten a metabolikus egyensúly felborulása oxidatív stresszt okoz, így a fagyűrés kialakulásában fontos szerep jut az antioxidáns védekező mechanizmusok indukciójának is. Alacsony hőmérsékleten búzában megnő az endogén hidrogénperoxid-szint (Okuda és mtsai., 1991), és oxidatív stressztolerancia indukálódik (Bridger és mtsai., 1994). A búza 5A kromoszóma befolyásolja a glutation felhalmozódását, illetve szabályozza a GR enzim mennyiségét, és így a redukált/oxidált glutation arányát is (Kocsy és mtsai., 2000a). Ennek bizonyítéka, hogy búzahajtásokban az összglutation-tartalom már 3 napos edzés után megnő, különösen a hidegtűrő Cheyenne genotípusban, illetve a Cheyenne 5A kromoszómát hordozó Chinese Spring kromoszóma szubsztitúciós vonalban (CS/Ch 5A). Egyes genotípusokban a megnövekedett GR enzimaktivitás következményeként a redukált/oxidált glutation aránya ugyancsak megnő (Kocsy és mtsai., 2000a). Más szerzők szintén az antioxidáns enzimek működésének alacsony hőmérséklet hatására bekövetkező változását tapasztalták, az eredmények azonban meglehetősen ellentmondásosak. A fagyűrő *Triticum aestivum* cv. Brasilia és a fagyérzékeny *Triticum aestivum* cv. Eridano búzafajtákkal végzett vizsgálatok során szintén a fagyűrő búzában volt nagyobb az antioxidáns enzimek aktivitása. Az akklimatizáció során a POD-aktivitás megnőtt, a kataláz aktivitása pedig lecsökkent (Sceba és mtsai., 1998). Ezzel szemben más szerzők különböző búzafajtákban szárazság- és hidegstressz együttes hatását vizsgálva arról számoltak be, hogy alacsony hőmérséklet nemcsak az aszkorbinsav-tartalom és a GR aktivitása, hanem a kataláz aktivitása is megnőtt. Normál hőmérsékleten szárazság hatására a GR aktivitás megnőtt, a kataláz aktivitása egyes fajtákban nőtt, másokban csökkent az (Keleş és mtsai., 2002).

## 2.2. Az oxidatív stressz

Ahogy azt már az előző fejezetekben is érzékeltettem, a legtöbb stresszhatás, beleértve az alacsony hőmérsékleti stresszeket is, közvetve vagy közvetlenül oxidatív károsodással jár együtt. A reaktív oxigénformák az aerob anyagcsere eredményeként különböző mértékben minden növényben jelen vannak. Stressz hatására azonban jelentősen megnőhet a reaktív oxigénszármazékok koncentrációja a sejtekben. Amennyiben ez a növekedés nagymértékűvé válik, a reaktív oxigénformák a legtöbb biomolekulával, elsősorban nukleinsavakkal, lipidekkel, fehérjékkel és szénhidrátokkal reakcióba lépve azokat károsítják, mely folyamat akár a sejt pusztulásához is vezethet.

### 2.2.1. A reaktív oxigénformák típusai

Gerjesztési energia hatására a molekuláris oxigénből szinglet oxigén ( $^1\text{O}_2$ ) keletkezik. Ez vizes közegben körülbelül 4  $\mu\text{s}$  ideig van jelen, majd átadja gerjesztési energiáját, illetve reakcióba lép egyes biológiai vegyületekkel és endoperoxidokat, vagy hidroperoxidokat hoz létre.

Egy elektron felvételével a molekuláris oxigénből szuperoxid-aniongyök ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) keletkezik, mely kinonokat vagy átmeneti fémkomplexekeket redukálhat, így befolyásolva egyes fémtartalmú enzimek aktivitását. Ez közepesen reakcióképes, rövid féléletidejű (2-4  $\mu\text{s}$ ) reaktív oxigénforma, mely nem jut át a sejtmembránon. Vizes oldatban egy proton felvételével hidroperoxil gyökké ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) alakul, mely már át tud jutni a sejtmembránon, és hidrogén atomok elvonásával lipid autooxidációt indíthat. A szuperoxid-gyök további elektronfelvétellel hidrogén-peroxiddá ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) alakulhat.

A hidrogén-peroxid közepes reakcióképességű, viszonylag hosszú (1 ms) féléletidejű molekula, amely bizonyos távolságra membránokon keresztül is képes diffundálni. Tiol-csoportjuk oxidációja által enzimeket is inaktiválhat (pl. Cu/Zn-SOD, Fe-SOD).

A legreaktívabb oxigénforma a hidroxil-gyök ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), mely hidrogén-peroxidból keletkezik a Haber-Weiss vagy Fenton reakció során fém katalizátor jelenlétében. A fémionok általában oxidált formában fordulnak elő a sejtekben. Szuperoxid-gyök jelenlétében azonban redukálódnak és így képessé válnak arra, hogy a hidrogén-peroxid átalakulását katalizálják hidroxil-gyökké. A hidroxil-gyök bármely biológiai molekulával képes reakcióba lépni, túlzott termelődése a sejt halálához vezet. A sejtek nem rendelkeznek olyan enzimmel, mely

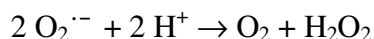
képes lenne eliminálni a hidroxil-gyököt, ezért fontos, hogy szigorú szabályozás alatt álljon a hidrogén-peroxid és a szuperoxid-gyök mennyisége a sejtekben.

### 2.2.2. Antioxidáns védekezőrendszerek

Az antioxidáns védekezőrendszert enzimatikus és nem-enzimatikus komponensekre különíthetjük el. A nem-enzimatikus rendszert antioxidáns tulajdonságú vegyületek alkotják, melyek lehetnek vízoldhatók, ezek között kiemelt fontosságú a glutation (GSH,  $\gamma$ -glutamil-ciszteinil-glicin) és az aszkorbinsav, illetve lipidoldhatók, mint például az  $\alpha$ -tokoferol, vagy a  $\beta$ -karotin. Az enzimatikus elemek egy része (APX, GR) e vegyületek reakcióit, regenerációját katalizálva vesz részt a reaktív oxigénformák eliminálásában. A legfontosabb enzimatikus antioxidánsokat több nagy rendszerbe sorolhatjuk, amelyek a reaktív oxigénformák keletkezésének helyén fordulnak elő. Ide tartoznak pl. a SOD-ok, a víz-víz ciklus, az aszkorbát-glutacion ciklus, a katalázok, és a glutation-peroxidáz ciklus (Mittler, 2002; Holuigue és mtsai., 2007). Megemlítendő, hogy szemben az állati sejtekkel, a növényekben a mitokondrium reaktív oxigénforma termelése az egész sejthez viszonyítva nem jelentős. Ennek egyik oka, hogy növényekben az egyik fő forrás a kloroplasztisz, amely az állatokban értelemszerűen hiányzik, másrészt a növényekben az alternatív oxidázok az oxigénnek vízzé való alakításával nagymértékben hozzájárulnak a reaktív oxigénformák mennyiségének csökkenéséhez is.

#### 2.2.2.1. Szuperoxid-dizmutázok

A szuperoxid-dizmutázok (SOD; EC 1.15.1.1) az oxidatív károsodás elleni védelem első vonalát alkotó fém-tartalmú enzimek, melyek a szuperoxid gyököket alakítják át hidrogén-peroxiddá a következő reakció alapján:



Minden aerob szervezetben megtalálhatók, növényekben a fém kofaktor alapján háromféle SOD-ot különböztetünk meg:

- Cu/Zn-SOD, elsősorban a citoszolban, de a kloroplasztisz sztrómában és a peroxiszómában is megtalálható,



- Mn-SOD, mitokondriális és peroxisomális enzim,
- Fe-SOD, csak egyes fajok kloroplasztiszaiban azonosították eddig (Bueno és mtsai., 1995).

#### 2.2.2.2. A víz-víz ciklus

A víz-víz ciklus lényege, hogy a fotoszintetikus elektrontranszportláncon a PS1-en keresztül érkező elektronok egy része molekuláris oxigénre kerülhet szuperoxidgyököt képezve. Ezt a SOD alakítja hidrogén-peroxiddá, melynek egy, a kloroplasztisz tilakoidmembránjában lokalizált APX monodehidro-aszkorbinsav lépződése mellett alakít vízzé. Az így keletkezett monodehidro-aszkorbinsav a PS1 ferredoxinja segítségével redukálódik ismét (Asada, 1999).

#### 2.2.2.3. Az aszkorbát-glutation ciklus

A kloroplasztiszokban nincs katalázaktivitás, így az ott keletkező  $H_2O_2$ -ot az ún. aszkorbát-glutation ciklus semlegesíti. A folyamat első lépéseként a keletkezett hidrogén-peroxidot a kloroplasztiszok sztrómájában lokalizált APX monodehidro-aszkorbinsavvá redukálja aszkorbinsav felhasználásával. A monodehidro-aszkorbinsav egyrészt spontán aszkorbinsavvá és dehidroaszkorbinsavvá diszproporcionálódik, másrészt NADPH-függő monodehidro-aszkorbinsav-reduktáz segítségével közvetlenül aszkorbinsavvá alakulhat. A diszproporció során keletkezett dehidroaszkorbinsav redukcióját a dehidroaszkorbinsav-reduktáz végzi redukált glutation (GSH) hidrogénjének a kárára. Az így keletkezett oxidált glutation (GSSG) redukcióját a GR enzim végzi NADPH felhasználásával. E rendszer enzimeit és szubsztrátjait nemcsak a kloroplasztiszban, hanem más sejtkompartimentekben is megtalálhatók (Klapheck és mtsai., 1990).

#### 2.2.2.4. Aszkorbát-peroxidázok

Az aszkorbát-peroxidázok (EC 1.11.1.11) vastartalmú fehérjék, melyek kulcsszerepet játszanak az oxidatív stressz elleni védelemben (Shigeoka és mtsai., 2002). Szemben a számos gvajakol-peroxidáz (EC 1.11.1.7) izoenzimmel, melyek a vakuólumban, sejtfalban vagy a citoszolban találhatók, az APX-ok a citoszolon kívül több elkülönült sejtkompartimentben, a kloroplasztisz sztrómájában ill. tilakoid membránjában, mikroszómákban, úgymint glioxiszómában és peroxisómákban, vagy membránhoz kötötten helyezkednek el.

Nemrégiben mitokondrium membránhoz kötött, ill. a kloroplasztok tilakoidmembránjának lumenében lokalizált APX jelenlétét is igazolták. Az APX-ok zöme nagy specifitással rendelkezik aszkorbinsavra nézve, bár egyes izoenzimek bizonyos mértékben képesek mesterséges donorokat (pirogallol, gvajacol) is használni. Jellemző rájuk, hogy különösen fotooxidatív körülmények között aszkorbinsav hiányában aktivitásukat veszthetik.

Jelenlegi ismereteink szerint *Arabidopsis* növényekben az *Apx* géncsaládot két citoszolikus (*AtApx1*, *AtApx2*), két peroxiszómás (*AtApx3*, *AtApx4*) és két kloroplasztidális gén (egy tilakoidkötött, *tAtApx* és egy sztróma-lokalizált, *sAtApx*) alkotja (Shigeoka és mtsai., 2002). Ezzel szemben rizsben jelenleg 8 *Apx* gén, két citoszolikus, két peroxiszómás és két kloroplasztidális ismert (Teixeira és mtsai., 2004), paradicsomban pedig feltehetően 7 *Apx* gén található.

#### 2.2.2.5. Glutation-reduktázok

A glutation-reduktázok (EC 1.6.4.2.) NADPH-függő heterotetramer enzimek, melyek a következő reakciót katalizálják:

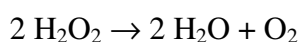


Növényekben a GR aktivitás nagy része a kloroplasztiszokban mutatható ki (Bielawski és Joy, 1986), de azonosították a mitokondriumban, a peroxiszómákban és a citoszólban is (Foyer és mtsai., 1991; Holuigue és mtsai., 2007). A fentebb említett aszkorbát-glutation cikluson kívül a citoszolban és a peroxiszómákban részt vesz az ún. glutation-peroxidáz ciklusban is a glutation-peroxidáz enzim hidrogéndonoraként szolgáló redukált glutation (GSH) regenerációja által (Holuigue és mtsai., 2007). Stresszhatásra az enzim aktivitása általában megnő, melynek szerepe lehet a tolerancia kialakulásában (Foyer és mtsai., 1991). Egyes vizsgálatok szerint a kukorica hidegtűrése szoros összefüggést mutat a GR aktivitásával. Gátolt enzimaktivitás hatására csökken a növények hidegtűrése (Kocsy és mtsai., 2000b), míg a hidegtűrés indukciója során a GR aktivitása megnő (Kocsy és mtsai., 2001a). Transzgenikus nyárfa növényekkel végzett vizsgálatokból kitűnik, hogy a GR-t túltermelő növények fokozott ellenállóságot mutatnak a fotoinhibícióval szemben (Foyer és mtsai., 1995). Ugyanakkor az összglutationszint növelése a glutation-szintetáz enzimet túltermelő transzgenikus növényekben nem eredményezett hasonlóan fokozott stressztoleranciát (Foyer és mtsai., 1995). A GR szerepe nem egyszerűen a hidrogén-peroxid

detoxifikációjában rejlik, hanem a redukált:oxidált glutation (GSH:GSSG) arány finom szabályozásával részt vesz a sejt redox állapotának kialakításában, a védekező folyamatok beindításában is (Foyer és mtsai., 1991).

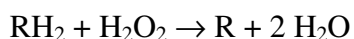
#### 2.2.2.6. Katalázok

A katalázok (EC 1.11.1.6.) a hidrogén-peroxid dizmutációval történő közömbösítését végzik az alábbi reakció alapján:



A  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrációtól függően azonban a kataláz enzimnek kétféle lehetséges működése van (Deisseroth és Dounce, 1970). Magas  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentráció mellett a fent leírt gyorsabb, ún. katalitikus módon működik. Ennek során mind a donor, mind pedig az akceptor szerepét a  $\text{H}_2\text{O}_2$  tölti be, így a kataláz egyszerre két molekula  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t képes közömbösíteni, és ehhez nem igényel redukáló erőt.

Alacsony hidrogén-peroxid koncentráció ( $<10^{-6}$  M) mellett viszont, az ún. peroxidatikus út működik, ahol különböző vegyületek (etanol, aszkorbát,  $\text{RH}_2$ ) tölthetők be a hidrogén-donor szerepét az alábbi reakció szerint.



A kataláz széles körben elterjedt enzim, mely aerob baktériumoktól kezdve a magasabbrendű növényekig és állatokig minden élőlényben előfordul. A kataláz négy alegységből felépülő *hem*-tartalmú enzim. Előfordul homo-, illetve heterotetramerként is. A különböző alegységek expressziója fejlődés- és szövetspecifikus. A növényi katalázokat egy kis géncsalád kódolja, mely általában három, de legfeljebb négy izoenzim génből áll. Kukoricában és dohányban jól ismert a különböző izoformák előfordulása, expressziójuk szabályozása (Scandalios és mtsai., 1997). Kukoricában három, egymástól független gént (*cat1*, *cat2* és *cat3*) találtak, melyek biokémiaiilag különböző kataláz enzimeket kódolnak (kataláz1, kataláz2 és kataláz3). A kataláz1 és kataláz2 izoenzimek a glioxiszómákban vagy peroxiszómákban, míg a kataláz3 fehérjék a mitokondriumokban találhatók. Ez utóbbi C-terminálisáról hiányzik a feltételezett peroxiszomális lokalizációs szignál (SRL motívum: Ser-Arg-Leu). Ugyanez figyelhető meg a rizs KatA és az árpa kataláz2 fehérjék esetében is, melyek aminosav-szekvenciájukban nagy hasonlóságot mutatnak. Ezt a fajta kataláz izoenzimet eddig csak egyszikűekben mutatták ki. A kataláz1 és kataláz2 izoenzimek előfordulnak homotetramerként, de ahol mindkét gén expresszálódik, heterotetramereket is

alkothatnak alegységeik. A kataláz3 *in vivo* csak homotetramer lehet, mert térben elkülönül a másik két izoformától. A háromféle izoenzim közül a kataláz3 biokémiai tulajdonságai térnek el leginkább a többitől. Egyrészt nagyobb peroxidatikus aktivitással bír, mint a kataláz1 vagy a kataláz2. A katalitikus és a peroxidatikus út aránya ( $R_{P/C}$ ) jellemzi az egyes kataláz enzimeket. A kataláz2 esetében ez  $R_{P/C} = 0,25$ , tehát az enzim inkább a katalitikus úton működik, míg kataláz3 esetében ( $R_{P/C} = 17,6$ ) a peroxidatikus út dominál. Másik jelentős különbség, hogy különféle gátlószerekkel szemben (aminotriazol, cianid, stb.) ellenállóbbnak bizonyul a kataláz3.

A kataláz gének expressziója egyrészt változik az egyedfejlődés során, másrészt a különböző szövetekben, illetve sejttípusokban is eltérő lehet (Scandalios és mtsai., 1997). A kukorica levélben például a kataláz1 és a kataláz3 izoenzim a mezofill sejtekben fordul elő, a kataláz2 pedig a hüvelyparenchima sejtek peroxiszómáiban (Tsaftaris és mtsai., 1983). Részletesen vizsgálták különböző kezelések, stresszek hatását a kataláz enzim expressziójára, és megállapították, hogy az egyes izoenzimek eltérően reagálnak. Külsőleg alkalmazott  $H_2O_2$  hatása koncentrációfüggő volt. Alacsony  $H_2O_2$  koncentráció (1 mM) serkentette a *cat1* expresszióját, míg magasabb koncentrációk hatására alacsony szintre csökkent. A *cat2* expressziója ellenben 10 mM  $H_2O_2$  felett mutatott indukciót. Alacsony hőmérséklet (14°C, illetve 4 °C) hatására megnőtt a kataláz mennyisége. Ez elsősorban a *cat1* indukciójából ered, a kataláz2 növekedése kisebb mértékű (Scandalios és mtsai., 1997).

A hidrogén-peroxid lebontásban a kataláznak elsődleges szerepe van (Willekens és mtsai., 1997). A katalázhiányos transzgenikus dohánynövényeken alacsony fényintenzitás mellett nem látszott kóros elváltozás, magas fényintenzitáson viszont szöveti elhalás történt, ami a fotorespiráció következménye volt. A nekrózis során a  $H_2O_2$  szint nem emelkedett meg, a kataláz hiányát ebből a szempontból kompenzálta a megemelkedett APX és POD aktivitás. Ellenben a sejt redox egyensúlya nem maradt fenn a kataláz hiányában: az oxidált glutation felhalmozódott, és az aszkorbát szint negyedére csökkent. (Willekens és mtsai., 1997). A katalázhiányos transzgenikus dohánynövények továbbá érzékenyebbnek bizonyultak a parakvát-, só- és ózonstresszre, viszont az alacsony hőmérséklettel szemben nem mutattak nagyobb érzékenységet (Willekens és mtsai., 1997).

### 2.2.3. A reaktív oxigénformák jelátviteli szerepe

Ahogy az előbbiekből látszik, a sejtekben a reaktív oxigénformák mennyiségét összetett antioxidáns védekező mechanizmusok szabályozzák. A reaktív oxigénformáknak

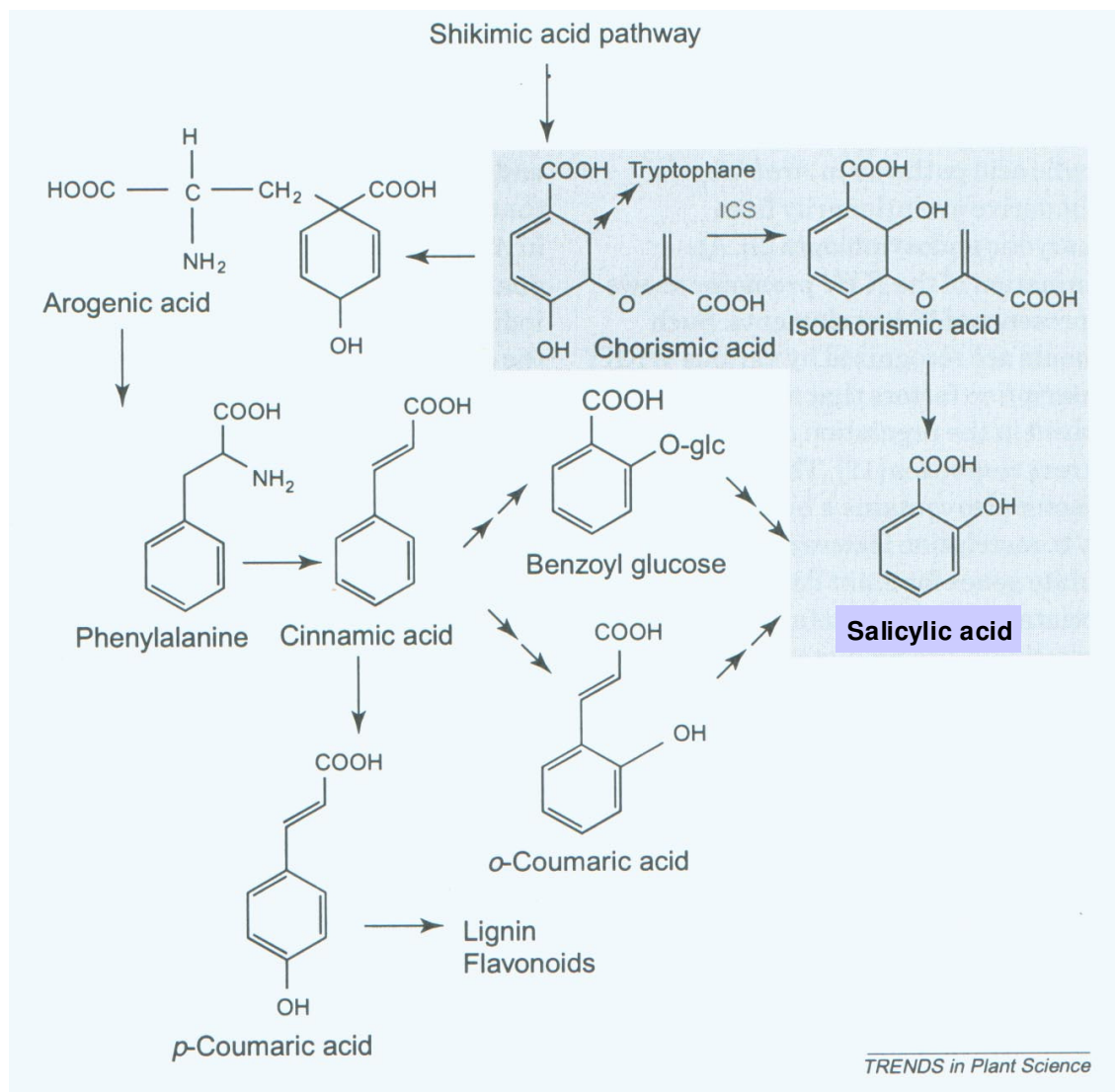
sejtkárosító hatásuk mellett azonban szerepük lehet jelátviteli folyamatokban is, elsősorban az antioxidáns és más védekező mechanizmusok beindításában (Prasad és mtsai., 1994b; Foyer és mtsai., 1997). Az antioxidánsok tehát nemcsak megakadályozzák a reaktív oxigénformák nagy mennyiségű felhalmozódását, hanem lehetővé teszik kis koncentrációváltozások érzékelését és finom szabályozását. Az elmúlt években számos esetben igazolták a reaktív oxigénformák génexpresszió-reguláló szerepét többek között biotikus stresszfolyamatok (Alvarez és mtsai., 1998), ózonstressz (Langebartels és mtsai., 2002) vagy pl. fénystressz (Karpinski és mtsai., 1999; Vandenabeele és mtsai., 2003; Vanderauwera és mtsai., 2005) során. Külsőleg adott abszcizinsav hatására megnő a  $H_2O_2$  mennyisége, így feltételezik, hogy a  $H_2O_2$  szerepet játszhat a különböző abszcizinsav-hatások közvetítésében, mint pl. a *cat1* expresszió, vagy a sztómazáródás indukciójában. A hidrogén-peroxid számos különböző stresszhatás következtében aktiválódó jelátviteli út közös komponense, így szerepe lehet a kereszttolerancia jelenségének kialakulásában (Pastori és Foyer, 2002). Dohány, paradicsom és nyírfajokban az ózon-indukált sejthalált hidrogén-peroxid felhalmozódás előzi meg, ezzel szemben *Arabidopsis*, *Rumex* és *Malva* fajok esetében a szuperoxidgyök a felhalmozódó reaktív oxigénforma (Wohlgemuth és mtsai., 2002). Szójabab esetében a NO és a  $H_2O_2$  aránya volt döntő a sejthalál indukciójában (Overmyer és mtsai., 2003).

Biotikus stresszválaszok mellett úgy tűnik, hogy abiotikus stresszek esetén is szerepet játszhat a membránkötött NADPH-oxidáz. Kukoricában kimutatták, hogy ozmotikus stresszre, illetve külsőleg adott abszcizinsav hatására megnő a NADPH-oxidáz aktivitása (Jiang és Zhang, 2002). Ezzel együtt megnőtt a levelek szuperoxid-gyök tartalma, és számos antioxidáns enzim aktivitása fokozódott (SOD, kataláz, APX és GR).

### 2.3. A szalicilsav élettani szerepe

A szalicilsav szó a fűzfa latin nevéből (*Salix*) ered. Mind az amerikai indiánok, mind az ókori görögök tudták már, hogy a fűzfa levele és kérge láz- és fájdalomcsillapító hatással bír. (Néha az az ember érzése, hogy eleink már szinte mindent felfedeztek, csak a tudás java elveszett, és kezdhethük a felfedezéseket újra és újra.) A szalicint a szalicil-alkohol glükozidját 1828-ban izolálták a fűzfa kérgéből. Az acetil-szalicilsav, ismertebb nevén az aszpirin a humán gyógyzatban mindmáig az egyik leggyakrabban alkalmazott „stresszcsökkentő” vegyület. A szalicilsav növényekben legnagyobb mennyiségben hőtermelő növények, mint pl. a vuduliliom (*Sauromatum guttatum* Schott.) virágzásakor, amikor a szövetek hőmérséklete akár 10-12 °C-kal is megemelkedhet, vagy patogénfertőzés során

mutatható ki (Raskin, 1992). Általában néhány  $\mu\text{g/g}$  friss tömeg mennyiségben fordul elő vagy szabad, vagy konjugált (glükozid, metilált, glükóz-észter vagy aminosav-konjugátum) formában (Lee és mtsai., 1995). Bioszintézise növényekben több úton is lehetséges (**1. ábra**).



**1. ábra.** A szalicilsav szintézisének lehetséges útjai növényekben (Métraux, 2002). Bővebben ld. a szövegben.

Az egyik lehetséges út a sikiminsav-úthoz kapcsolódóan fenilalaninból indul ki. Innen két út lehetséges. Az egyik szerint a fahéjsav oldallánca dekarboxilálódik, benzoessavvá alakul, majd 2-es pozícióban hidroxilálódik. Ezt az utat írták le például dohányban (Yalpani és mtsai., 1993) vagy rizs hajtásokban (Silverman és mtsai., 1995). A fahéjsav  $\beta$ -oxidációjáért felelős enzimet már *Quercus pedunculata*-ban azonosították (Alibert és Ranjeva, 1971; Alibert és mtsai., 1972), a benzoessavnak szalicilsavvá történő átalakításáért felelős enzimet

azonban még nem sikerült izolálni. Meg kell jegyezni, hogy újabb vizsgálatok szerint a szalicilsav közvetlen prekursora nem a benzoésav maga, hanem ennek glükozidja (Yalpani és mtsai., 1993; Chong és mtsai., 2001). A másik lehetséges út szerint a fahéjsav transz-cinnamát-4-hidroxiláz segítségével (Alibert és Ranjeva, 1971; Alibert és mtsai., 1972) o-kumársavvá (o-hidroxi-fahéjsav; oHCA) alakul, aminek dekarboxilációja vezet a szalicilsav szintéziséhez. Az o-kumársav – szalicilsav átalakulásért felelős enzimet még nem izolálták.

Legújabb adatok szerint magasabbrendű növényekben egy alternatív szintézisút is lehetséges. Az addig csak baktériumokban ismert út szerint a kloroplasztiszokban korizminsavból kiindulva izokorizminsav-szintáz (ICS) segítségével izokorizminsav képződik, amiből szalicilsav szintetizálódhat (Wildermuth és mtsai., 2001).

Növények esetében a legelső élettani hatás, amit a szalicilsavról közöltek, dohány szövettényészetek virágzásindukciójáról számolt be (Lee és Skoog, 1965). A szalicilsav másik jól ismert hatása a termogén növényekben a hőtermelés indukciója. A növényekben előforduló hőtermelést *Arum* fajok esetében már Lamarck is leírta 1778-ban. E fajoknál a hőtermelés elsősorban az illatanyagok könnyebb kibocsátását teszi lehetővé. A virágzás egyes periódusaiban a virág hőmérséklete 12°C-kal is megemelkedhet. *Sauromatum guttatum* fajban kimutatták, hogy a hőtermelés indukciójáért felelős ún. kalorigén anyag nem más, mint a szalicilsav (Raskin és mtsai., 1987). Bizonyítást nyert, hogy a szalicilsav hatására megemelkedő alternatív oxidáz expresszió játszik szerepet a termogenezis indukciójában (Rhoads és McIntosh, 1992). Dohánylevelekben, mely nem termogén szövet, szintén kimutattak hőtermelést miután exogén szalicilsav vagy rokon vegyülete, a 2,6-dihidroxi-benzoésav hatására 0,5-1°C hőmérsékletemelkedést mértek. Bizonyították, hogy ebben az esetben is az alternatív légzés intenzitásának növekedése áll a hőtermelés hátterében (Van der Straeten és mtsai., 1995).

A szalicilsavnak a növekedésszabályozó hatása is ismert (Arberg, 1981), bár ezzel kapcsolatban az irodalmi adatok nem egyértelműek. A kapott eredmények ugyanis nagyban függenek a növényfajtól, az alkalmazás módjától, ill. a koncentrációtól. Szalicilsav vagy bizonyos analógjai, mint pl. acetyl-szalicilsav kukorica vagy szója esetében levélre juttatva növelte annak felületét és szárazanyag-tartalmát, anélkül, hogy a növényt magasság, vagy a gyökértömeg megváltozott volna (Khan és mtsai., 2003). Más kísérletekben alacsony koncentrációjú ( $10^{-8}$  M) szalicilsav-oldattal történő permetezés hatására szójanövényekben gyökérnövekedésről is beszámoltak (Gutiérrez-Coronado és mtsai., 1998). Az eredmények azt mutatják, hogy a növekedésfokozás csak egy adott koncentráció-optimum mellett következik be, ahogy azt pl. *Brassica juncea* (Fariduddin és mtsai., 2003), vagy búzanövényekben (Hayat

és mtsai., 2005) is bemutatták, de e fölött növekedésgátlás lép fel (Pancheva és mtsai., 1996; Christianson és Duffy, 2002). A szalicilsav a fotoszintézist is befolyásolja, ugyanis árpa növények fotoszintetikus aktivitását gátolta a hosszútávú szalicilsav-kezelés, a Rubisco enzim mennyiségének csökkentése révén (Pancheva és Popova, 1998). Búza növényeket szalicilsavval 7 napig kezelve azt tapasztalták, hogy míg alacsony (0,05 mM) koncentrációban a szalicilsav elősegíti a fotoszintézist, nagyobb mennyiségben (0,5-1 mM koncentráció mellett) gátolja a fotoszintetikus aktivitást. Ez a gátlás elsősorban a PS1 elektrontranszportjának gátlásából és a citokróm  $f_{554}$  mennyiségének csökkentéséből adódik. Izolált tilakoidokat szalicilsavval kezelve azonban semmilyen hatást nem találtak (Sahu és mtsai., 2002). A szalicilsav egyéb élettani hatásairól ld.: Hayat és Ahmad, 2007.

### 2.3.1. A szalicilsav szerepe biotikus stresszek során

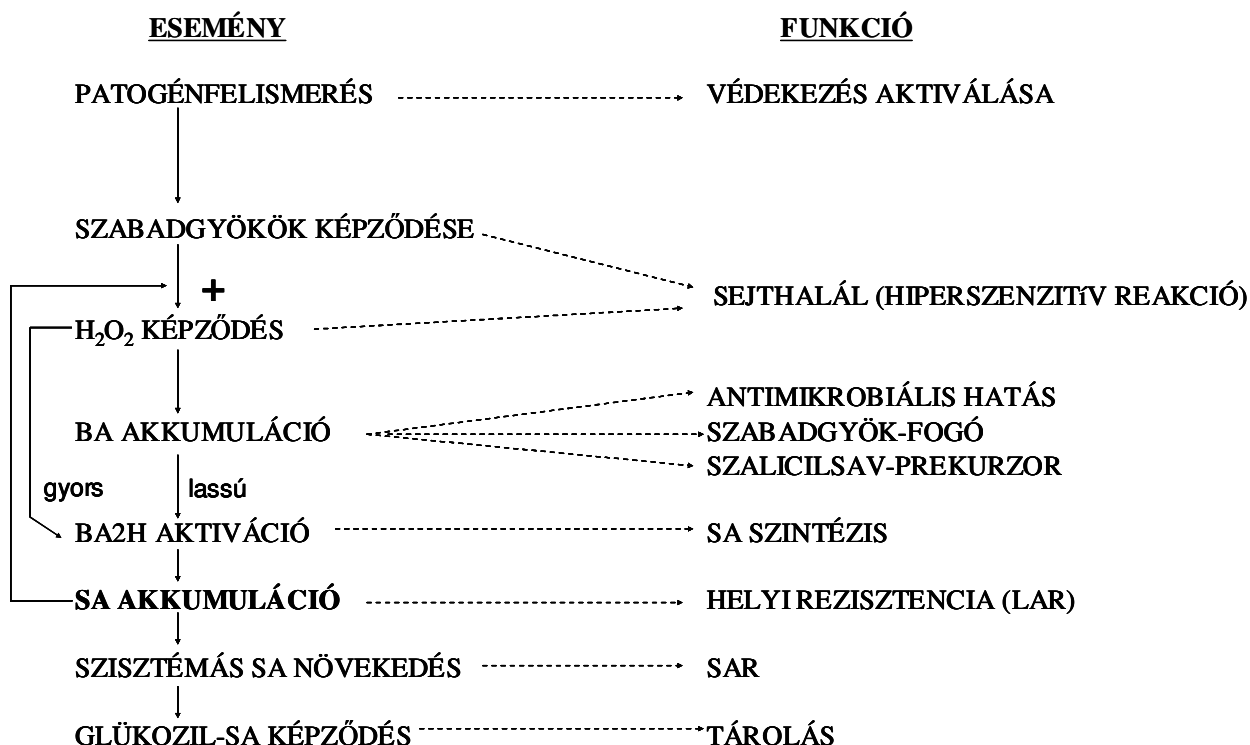
Az első megfigyelések, amik a szalicilsav stresszélettani szerepére utaltak biotikus stresszfactorokkal voltak kapcsolatosak. Akárcsak a legtöbb magasabbrendű szervezet, a növények zöme is folyamatosan ki van téve a különféle mikroorganizmusok támadásainak. Ennek ellenére megbetegedés ehhez képest viszonylag ritkán alakul ki. Köszönhető mindez azoknak a sokrétű védekezési mechanizmusoknak, amelyeket a növények az evolúció során kifejlesztettek. Már a 70-es években kimutatták, hogy ha aszpirint, mely vizes közegben spontán szalicilsavvá alakul, dohány levelekbe fecskendeznek, akkor a növény védetté válik egy ezt követő dohánymozaik-vírus támadással szemben (White, 1979). A későbbiekben számos bizonyíték szólt amellett, hogy szalicilsav szükséges a szisztémikus szerzett rezisztencia kialakításához is. Uborka növényekben a szerzett rezisztencia kialakulásakor megnő az endogén szalicilsav szint (Métraux és mtsai., 1990). Dohánymozaik-vírussal fertőzött dohánylevelekben a nekrotikus lézióban és annak környékén szintén szalicilsavszint növekedés volt tapasztalható (Malamy és mtsai., 1990; Enyedi és mtsai., 1992). Szalicilsav felhalmozásra képtelen transzgenikus dohány növények, melyek a bakteriális eredetű szalicilát-hidroxiláz enzim génjét (*NahG*) hordozzák, képtelenek a szisztémikus szerzett rezisztencia kialakítására (Gaffney és mtsai., 1993). A szalicilsav részvételét bizonyították a hiperszenzitív reakció (HR) kialakításában és jelátviteli folyamatában is. Exogén szalicilsav hatására patogenezis-kapcsolt (*pathogenesis related*, PR) fehérjék szintetizálódnak (Malamy és mtsai., 1990; Yalpani és mtsai., 1991). Egyes funkcionális analógjai, mint pl. 2,6-dikloroizotonikotinsav (INA), vagy a benzotiadiazol-S-metilészter (BTH) adagolásával hasonló hatást, PR-proteinek indukcióját lehetett elérni (Malamy és Klessig, 1992; Wasternack és



mtsai., 1994). Az eddig vizsgált növények közül kivételt csak a rizs és a burgonya mutatnak: ezekben a növényekben külsőleg adagolt szalicilsavval nem minden esetben sikerült hatékony PR-indukciót kiváltani. Meg kell azonban jegyezni, hogy rizsben és burgonyában már az alap szalicilsavszint több nagyságrenddel meghaladja a többi fajban a fertőzés hatására megnövekedett szintet is (Coquoz és mtsai., 1995; Silverman és mtsai., 1995). Mindezek ellenére az endogén szalicilsav ezekben a fajokban is szerepet játszik a patogéntámadás elleni védelemben (Yu és mtsai., 1997).

Általánosságban, vírustámadás esetén a szalicilsav gátolja a vírus szaporodását, sejtről sejtre való, valamint nagy távolságra történő mozgását (Singh és mtsai., 2004). Modulálja a hiperszenzitív reakcióhoz kapcsolt sejthalált, szabályozza a reaktív oxigénfajták szintjét, ezáltal befolyásolja a lipidperoxidáció mértékét is (Dempsey és mtsai., 1999; Shah és Klessig, 1999). Ugyanakkor egyes vizsgálatok arra utalnak, hogy nem a szalicilsav az a transzportált szignálmolekula, amely a fertőzés helyéről a távolabbi szövetekbe szállítódik (Vernooij és mtsai., 1994).

Az első modell, mely magába foglalja a szalicilsav-bioszintézis és a patogén-ellenállóság kialakulásának kapcsolatát, a **2. ábrán** látható:



**2. ábra.** A szalicilsav bioszintézis és a patogénellenállóság kapcsolata (León és mtsai., 1995 után). BA: benzoésav; BA2H: benzoésav-2-hidroxiláz; LAR: lokális szerzett rezisztencia; SA: szalicilsav; SAR: szisztemikus szerzett rezisztencia.

Nemcsak a szalicilsav hatására nő meg a reaktív oxigénformák mennyisége a sejtben, hanem bizonyítékok szólnak amellett is, hogy a reaktív oxigénformák szalicilsav felhalmozódást okoznak (León és mtsai., 1995, Enyedi 1999). Ez a megfigyelés vezetett egy öngerjesztő szalicilsav-hidrogén-peroxid ciklus hipotéziséhez, amely ciklus a reaktív oxigénformák felhalmozódását és a sejt halálát eredményezi (Van Camp és mtsai., 1998). A nekrotikus léziók kialakulását és terjedését magyarázó modellben központi szerepet játszik ez az öngerjesztő ciklus, mely által megnő a reaktív oxigénformák mennyisége, és programozott sejthalál indukálódik (Overmyer és mtsai., 2003). Ebben a folyamatban a szalicilsav és az etilén együttes hatására van szükség. Az apoplastban a szuperoxid-gyök, illetve az etilén tölti be a jelátviteli szerepet a környező sejtek felé, a programozott sejthalál indukációjában. A nekrotikus lézió terjedésének megállításáért a sejthalál során keletkező jázmonsav felelős, mely egyrészt a szalicilsav-szintézist gátolja, másrészt az etilén-hatásra érzéketlenné teszi a sejteket.

Mindezek után logikusan vetődött fel a kérdés, hogy vajon abiotikus stresszfolyamatok során van-e valami hatása a szalicilsavnak?

### *2.3.2. A szalicilsav szerepe oxidatív stressz során*

Ismert, hogy a sejt anyagcsere-egyensúlyának felborulása következtében szinte valamennyi stresszfaktor működése oxidatív stresszhatással jár együtt. Ennek egyik legnyilvánvalóbb jele a lipidperoxidok mennyiségének a növekedése. Vannak olyan anyagok, mint pl. a parakvát vagy az ózon, melyek közvetlenül képesek oxidatív stresszt előidézni. A szalicilsavnak az oxidatív stresszel való kapcsolatát bizonyítják azok a megfigyelések, melyek arról számolnak be, hogy a szalicilsav és egyes származékai képesek védelmet biztosítani ilyen típusú vegyületek ellen is. Az első ilyen kísérlet arról számol be, hogy dohány és uborka növényekben a szalicilsav előkezelés (Na-szalicilát formájában permetezéssel) csökkentette a parakvát okozta oxidatív stresszt (Strobel és Kuc, 1995). Más kísérletben fiatal árpa növényeket 1 napig 0,5 mM szalicilsavval kezelve oly módon, hogy a levágott növény a szalicilsavat a szállítószövein keresztül vette fel sötétben, megelőzhető volt a parakvátnak a az előkezelést követően fényen tapasztalható fotoszintézist gátló hatása. Ugyancsak csökkent a parakvát hatására bekövetkező hidrogénperoxid-szint növekedés, a lipidperoxidáció, és a membránkárosodás (Ananieva és mtsai., 2002). Mindezek a folyamatok egyes antioxidáns enzimek aktivitásának fokozódásával is együttjártak (Ananieva és mtsai., 2004).

UV- és ózonkezelés szalicilsav felhalmozódást okozott, valamint PR fehérje szintézist és vírus-rezisztenciát indukált dohányban (Yalpani és mtsai., 1994). *Arabidopsis thaliana* növényekben is kimutatták a szalicilsav szerepét az ózonstressz elleni védelemben, mivel a *NahG* növények érzékenyebbek voltak az ózon károsító hatására. Az ózon-indukált mRNS-ek egy részének szintézise szalicilsavfüggő, közülük csak néhány jelent meg a transzgenikus növényekben. Az ózonhatásnak kitett növények fokozott ellenállóságot mutattak virulens *Pseudomonas syringae* törzsekkel szemben. Az eredmények azt mutatják, hogy az ózon- és a patogénindukált rezisztencia kialakulása átfed, és mindkettő szalicilsavfüggő (Sharma és mtsai., 1996). Más szerzők kimutatták, hogy mind a szalicilsav hiánya, mind a túlzott felhalmozódása emelkedett ózonérzékenységhoz vezethet (Rao és Davis, 1999). A szalicilsavat felhalmozó (hiperakkumuláló) *Cvi-0 Arabidopsis* genotípus ózonszenzitív, mivel az ózonstressz során a nagy mennyiségű szalicilsav oxidatív folyamatokat indít el, mely a hyperszenzitív reakcióhoz hasonló sejtelhaláshoz vezet. A szalicilsav felhalmozásra képtelen *NahG* növényekben viszont a kellő mértékű antioxidáns válaszreakció elmaradása vezetett a megnövekedett ózonérzékenységhoz (Rao és Davis, 1999). A *Cvi-0:NahG* genotípusban a szalicilsav hiánya csökkenti az ózon-indukált sejtelhalás mértékét. Metil-jazmonáttal történő előkezelés megakadályozza a szalicilsav és hidrogén-peroxid felhalmozódását, és így megelőzi az ózon-indukált nektrózist (Rao és mtsai., 2000). Külsőleg adagolt szalicilsavval végzett kísérletek szintén azt mutatják, hogy a túlzott mértékű felhalmozódás érzékennyé teheti a növényt az ózon indukálta oxidatív stresszel szemben (Rao és mtsai., 2002). Ezek az eredmények is arra utalnak, hogy a szalicilsav egy igen érzékeny és összetett szabályozási folyamat részét képezi (Horváth és mtsai., 2007; Janda és mtsai., 2007).

### 2.3.3. A szalicilsav lipidperoxidációt kiváltó hatása

Az előzőekből is látszik, hogy a túlzott mértékű szalicilsav mennyiség szintén stresszként jelentkezik. A szalicilsav, illetve biológiailag aktív analógjai lipidperoxidációt okozhatnak, ahogy azt pl. dohány sejtszuspenziós kultúrában is kimutatták (Anderson és mtsai., 1998). Szalicilsav kezelés *Arabidopsis*-ban is lipidperoxidációt okozott, valamint fehérjék oxidatív károsodásához, illetve klorofill- és karotinoidok kialakulásához vezetett. Hidrogén-peroxid kezelés önmagában nem okozott ugyanilyen mértékű károsodást a membránokban és fehérjékben. Dimetil-tiourea, mely csökkentette a hidrogén-peroxid szintjét, mérsékelte a szalicilsav kezelés károsító hatását is (Rao és mtsai., 1997). Hasonló megfigyelést tettek a szalicilsav szomatikus embriogenezisre gyakorolt indukcióját vizsgálva

*Astragalus adsurgens* Pall. kalluszkultúrában is. A szalicilsav 0,2 mM koncentrációban megnövelte az endogén hidrogénperoxid-szintet. Külsőleg adott hidrogén-peroxid azonban nem helyettesítette teljes mértékben a szalicilsav hatását (Luo és mtsai., 2001). Mindebből arra lehet következtetni, hogy a szalicilsav hatásnak csak részben a hidrogén-peroxid a közvetítője. A hidrogén-peroxid mellett szerepet játszhat a kataláz gátlásakor keletkező szalicilsav-szabadgyök és az általa okozott lipidperoxidáció is (Anderson és mtsai., 1998; Klessig és mtsai., 2000).

A szalicilsav hatásmechanizmusát kutatva az első fehérje, melyről bebizonyosodott, hogy képes a szalicilsavat megkötni, a dohányból izolált kataláz enzim volt (Chen és Klessig, 1991). Kimutatták továbbá, hogy a szalicilsav nemcsak, hogy képes az enzimhez kötődni, hanem gátolja is annak működését (Conrath és mtsai., 1995). A szalicilsav katalázgátló hatásáról feltételezik, hogy magyarázhatja a megnövekedett hidrogénperoxid-szintet, és így szerepet játszhat a szisztémikus szerzett rezisztencia kialakulásában (Chen és mtsai., 1993a). Ennek ellenére még mindig kétséges a katalázgátlás jelentősége a rezisztencia indukciójában, mivel nem minden növény esetében figyeltek meg egyértelmű gátlást. Míg *Arabidopsis*, paradicsom, uborka és dohány fajokban a szalicilsav egyaránt jelentős *in vitro* katalázgátló hatást mutatott, kukoricában és rizsben nem találtak szignifikáns gátlást (Sánchez-Casas és Klessig, 1994). A különböző kataláz izoenzimok szövetspecifikus expressziója különbséget eredményezhet a szalicilsav adott szövetben kifejtett hatásában. Kukorica scutellumból izolált kataláz2 izoenzim aktivitásában az *in vitro* alkalmazott szalicilsav jelentős koncentrációban (1 mM) is csak enyhe gátlást (9%) váltott ki (Guan és Scandalios, 1995). Dohányban viszont mindegyik kataláz izoenzim gátolható volt szalicilsavval (Durner és Klessig, 1996). A kukoricához hasonlóan rizsben is különbség mutatkozott a kataláz izoenzimok között szalicilsav iránti érzékenységükben: a KatA izoenzim aktivitása nem gátlódott szalicilsav hatására, míg a KatB igen (Chen és mtsai., 1997).

Összehasonlítottak több benzoesavszármazékot katalázkötésük, illetve gátlóhatásuk szempontjából. A vizsgált vegyületek közül legjelentősebb gátlást a szalicilsav, a 2,3-dihidroxi-benzoésav és a 2,6-dihidroxi-benzoésav esetében mutatták ki. Ezek a vegyületek bizonyultak a leghatékonyabbnak a PR-fehérjék expressziójának indukciójában is. A 4-hidroxi-benzoésav viszont, mely PR-fehérjék expresszióját nem váltja ki, nem kötődött jelentős mértékben a katalázhoz sem (Chen és mtsai., 1993a, Rüffer és mtsai., 1995).

A katalázgátlás mechanizmusára több elképzelés is született. Az egyik elmélet szerint a kataláz aktív centrumában lévő *hem* vassal alkot komplexet a szalicilsav (Rüffer és mtsai., 1995). Ez a tanulmány megkérdőjelezi a szalicilsav katalázgátlásának biológiai jelentőségét

annak alapján, hogy a szalicilsav katalázkötése nem specifikus, mert más vastartalmú fehérjéhez, pl. akonitázhoz is képes kötődni. A katalázgátlás mechanizmusát illetően a másik elmélet feltételezi, hogy a szalicilsav, mint elektrondonor a katalázt a lassabb, peroxidatív útra tereli ( $\beta$ -aktivitás). Alacsonyabb hidrogénperoxid-szint mellett ez gátlásként jelentkezik, míg káros szintű hidrogén-peroxid ellen védi az enzimet, megakadályozva annak inaktivációját (Durner és Klessig, 1996). A katalázgátlás során azonban a szalicilsav szabadgyökké alakul, amely a továbbiakban lipidperoxidációt okozhat. Mind a katalázgátlás nyomán megemelkedett hidrogénperoxid-szintről, mind a gátlás során keletkező lipidperoxidokról feltételezik, hogy részt vesznek a szalicilsavfüggő rezisztencia kialakulásának jelátviteli folyamatában (Anderson és mtsai., 1998).

#### *2.3.4. A szalicilsav szerepe abiotikus stresszfolyamatok során*

Az előzőekben leírtakból látszik, hogy a szalicilsav számos olyan anyagszereű szabályozásában részt vesz, mely közvetve vagy közvetlenül kapcsolatba hozható valamely abiotikus stresszfaktorral kapcsolatos védekezési folyamattal is. Az 1990-es évek közepétől kezdve számos labor vizsgálta, hogy a szalicilsav hogyan képes befolyásolni egyes növények stressztűrőképességét. Ezekbe a munkákba a csoportunk is bekapcsolódott. Az alábbiakban röviden ismertetek néhány olyan eredményt, mely a szalicilsavnak az egyes stresszfaktorokkal szembeni lehetséges védő hatásait tárgyalja. (Bővebben ld. Janda és mtsai., 2007a; Horváth és mtsai., 2007.)

##### *2.3.4.1. Toxikus fémek*

Az egyik legelső munka, mely a szalicilsavnak valamely abiotikus stresszfaktor elleni védő hatásról számol be, azt mutatja, hogy szalicilsav-kezelés megnövelte uborka és dohánynövények réztoleranciáját (Strobel és Kuc, 1995). Később napraforgóban is hasonló hatásról számoltak be (El-Tayeb és mtsai., 2006). A szalicilsav szintén segítette a rizsnövények csírázását és hajtásnövekedését ólom- és higanystressz mellett (Mishra és Choudhuri, 1997). Árpa növényeket szalicilsavval előkezelve csökkent a Cd-stressz okozta biomasszagarapodás csökkenése, valamint a lipidperoxidáció mértéke, annak ellenére, hogy ebben az esetben a szalicilsavkezelés hatására az antioxidáns aktivitás nem fokozódott jelentősen. Sőt ellenkezőleg: a Cd-stressz váltott ki egy antioxidáns aktivitásnövekedést, ami a szalicilsavval kezelt növények esetében kisebb mértékű volt (Metwally és mtsai., 2003).

Kukoricánövények esetében ugyanaz a kezelés, ami más esetben javította a növények hidegtűrését (Janda és mtsai., 1999a), csökkentette a Cd felvételét is, viszont mivel önmagában is stresszként jelentkezett, a károsodási tünetek ebben az esetben fokozódtak (Pál és mtsai., 2002; Szalai és mtsai., 2005). Ezzel szemben, amikor a növények a csírázás előtt a magok áztatása során kapták a szalicilsavat, jobban tolerálták a Cd-ot, mint szalicilsavas előkezelés nélkül (Kranter és mtsai., 2007). Cd kezelés hatására árpyában (Metwally és mtsai., 2003) és kukoricában is (Pál és mtsai., 2005; Kranter és mtsai., 2007) szalicilsavszint növekedés volt kimutatható.

#### 2.3.4.2. Hőstressz

Az első munka, mely a szalicilsav hőtűrés befolyásoló hatásával foglalkozik, azt mutatta, hogy mustárnövényeket szalicilsavat tartalmazó oldattal permetezve megnövelte azok hőtűrését (Dat és mtsai., 1998a). A védőhatás koncentrációfüggő volt, és csak alacsony koncentrációtartományban (0,01-0,1 mM) érvényesült (Dat és mtsai., 2000). Mind a 0,01 mM-os szalicilsavkezelés, mind a melegezés megnövelte a sejtek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tartalmát, és lecsökkentette a növényekben a kataláz aktivitást. Később más szerzők borsó növényekkel hasonló eredményt kaptak, miközben szalicilsavszintézis inhibitorainak alkalmazásával igazolták a szalicilsav közvetlen szerepét a hőtűrés kialakulásában (Pan és mtsai., 2006). Uborka növényekben érdekes módon a levelek permetezése szalicilsavval növelte a növények hőtűrését, a tápoldathoz adagolva viszont csökkentette azt (Shi és mtsai., 2006). Ezzel párhuzamosan, szemben a mustár növényeknél kapottakkal, uborkában a permetezés növelte, a tápoldathoz adagolás csökkentette a kataláz aktivitást. *Arabidopsis* növények esetében is ismert, hogy a szalicilsav jelentősen befolyásolja a hőtoleranciát (Larkindale és Knight, 2002). Egyes szerzők szerint azonban a szalicilsav csupán az alap-, tehát a melegezés nélküli (Clarke és mtsai., 2004), mások szerint viszont az ún szerzett (melegezés után kialakuló) termotoleranciában is szerepe van (Larkindale és mtsai., 2005). Mind a hőaklimatizáció (Dat és mtsai., 1998b; Pan és mtsai., 2006; Wang és Li, 2006), mind a drasztikus hőstressz (Larkindale és Huang, 2005) hatására szalicilsavfelhalmozás (szabad és kötött formákban) figyelhető meg.

#### 2.3.4.3. Szárazság és sóstressz

Só- és ozmotikus stresszt illetően a szalicilsav hatása néha ellentmondásos. *Arabidopsis* növényekben a szalicilsav só- és ozmotikus stresszek során fokozta a reaktív oxigénformák termelődését, ezáltal felerősödtek a károsodási tünetek (Borsani és mtsai., 2001). NaCl- vagy mannitolkezelés során a szalicilsav felhalmozásra képtelen *NahG* növények kevésbé mutattak nekrotizációs tüneteket, mint vad típusú társaik. Ezzel szemben amikor búza növényeket alacsony koncentrációjú (0,05 mM) szalicilsavoldattal kezeltek, a növények növekedése erőteljesebb volt a kezeletlen, kontroll növényekéhez képest. Mindez egy megnövekedett abszcizinsav- és prolinfelhalmozással járt együtt (Shakirova és mtsai., 2003). Más szerzők hasonló eredményt kaptak, amikor árpa növények magjait elültetés előtt 1 mM szalicilsavas oldatban áztatták, és a növények sótoleranciája megnőtt (El-Tayeb, 2005). Kukorica esetében a talajt szalicilsavat tartalmazó oldattal locsolva kaptak védőhatást. Ebben az esetben a szalicilsavval kezelt növényekben a  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  felhalmozás, a lipidperoxidáció, valamint a membránpermeabilitás-növekedés kisebb mértékű volt (Gunes és mtsai., 2006). Paradicsomnál más szerzők hasonló eredményt kaptak, kimutatva, hogy a fotoszintetikus apparátus működése is kevésbé sérült a szalicilsavval kezelt növények esetében (Stevens és mtsai., 2006).

Rizs növényekben sókezelés hatására endogén szalicilsavszint-növekedést figyeltek meg, amit a szalicilsavszintézis egyik kulcsenzimének, a benzoészav-2-hidroxiláznak fokozott indukciójával magyarázhatunk (Sawada és mtsai., 2006). Ezzel szemben korábban más szerzők *Iris hexagona* növényekben sókezelés hatására magasabb abszcizinsav- és jázmonsav- de alacsonyabb szalicilsavszintet kaptak (Wang és mtsai., 2001).

Búzaszemeket acetilszalicilsavval áztatva javult a növények ellenállósága szárazságstresszel szemben (Hamada, 1998; Al-Hakimi és Hamada, 2001). Paradicsom és bab növényekben a szalicilsav, illetve az acetilszalicilsav 0,1 mM és 0,5 mM koncentrációban is hatékonynak bizonyult a szárazságstressz elleni védelemben, mind a magokat áztatva 1 napig, mind kéthetes növényeket talajon keresztül kezelve a szárazságstressz előtt 1 héttel (Senaratna és mtsai., 2000). Más szerzők árpa (Bandurska és Stroinski, 2005) és búza növényekkel hasonló védő hatást kaptak (Singh és Usha, 2003; Agarwal és mtsai., 2005a). Kukoricában viszont annak ellenére, hogy az 1 napig tartó 0,5 mM szalicilsav előkezelés (tápoldathoz adagolva) megnövelte a növények poliamin-tartalmát és hidegtűrését is, mégsem javított azok szárazságtűrésén. Búza növényeket ugyanilyen módon előkezelve szintén negatív hatást

tapasztaltak (Németh és mtsai., 2002). Az eredmények sokfélesége arra utal, hogy a kezelés módja és a növény fejlődési stádiuma jelentősen befolyásolja a szalicilsav hatását.

Több más, eddig ismertetett stresszorhoz hasonlóan a szárazság is képes szalicilsav-akkumulációt előidézni (Munne-Bosch és Penuelas, 2003; Bandurska és Stroinski, 2005). Amennyiben a szárazságstressz megszűnik, a szalicilsavszint is helyreáll.

#### *2.3.4.4. A szalicilsav szerepe alacsony hőmérsékleti stressz során*

Mi bizonyítottuk először, hogy fiatal kukoricanövények esetében szalicilsav kezeléssel az alacsony hőmérsékleti stressz károsító hatásai csökkenthetők (Janda és mtsai., 1997; 1999b; Szalai, 1997a). Kimutattuk, hogy a védőhatás az antioxidáns működés megváltozásával járt együtt. Egy napos 0,5 mM szalicilsav-kezelés hatására az antioxidáns enzimek közül a kataláz aktivitása lecsökkent, a GR, és a POD aktivitása nőtt. Szalicilsav hatására csökkent a hideg-indukált etiléntermelés is (Szalai és mtsai., 2000). Később más szerzők több más növényfajokon is hasonló eredményekről számoltak be. Tekintettel arra, hogy ez a kutatási terület szorosan kapcsolódik jelen dolgozat témájához, az ezzel kapcsolatos információkat az Eredmények, ill. Az eredmények megvitatása c. fejezetekben közlöm.

#### *2.4. A termolumineszcencia*

Tekintettel arra, hogy a termolumineszcencia egy olyan módszer, melynek növényi mintában való mérésére szolgáló készülék jelenleg normál kereskedelmi forgalomban még nincs, így az elterjedése is korlátozott, jelen fejezetben röviden ismertetem az elméleti hátterét.

Termolumineszcencián azt a jelenséget értjük, mikor egy előzetesen gerjesztett minta sötétben történő felmelegítése során fényt bocsát ki. A jelenséget növényekben 1957-ben fedezték fel először (Arnold és Sherwood, 1957). A növényekben jelentkező termolumineszcencia magyarázatára az ún. töltésrekombináción alapuló elmélet a legelfogadottabb (Vass és mtsai., 1980, 1981; Sane és Rutherford, 1986; Demeter és Govindjee, 1989; Vass és Inoue, 1992). Ennek lényege, hogy a fotoszintézishez elnyelt foton energiája a reakciócentrumban töltésszétválasztást indukál. A negatív és a pozitív töltések további töltésszétválasztási lépések sorozatán keresztül végül valamelyik akceptor és donor molekulán tárolódnak. Minden egyes töltésszétválasztási lépésben elvész az elnyelt foton energiájának egy része. Az ún. szabadenergia-veszteségek stabilizálják a töltésszétválasztást, megakadályozva a fordított irányú töltésvándorlást, amely a pozitív és negatív töltések rekombinációjához és a tárolt



szabadenergia elvesztéséhez vezetne. A töltésszétválasztási folyamat visszafordítása az elveszett szabadenergia visszatáplálását, azaz egy potenciálgát leküzdését igényli. A töltésrekombináció előidézéséhez szükséges szabadenergiát aktiválási szabadenergiának nevezzük, mely egyenlő az elektrontranszportlánc egyes töltésszétválasztási lépéseinek során bekövetkező szabadenergia veszteségek összegével. A második fotokémiai rendszerben (PS2) mind az akceptor, mind a donor oldalon található olyan elektrontranszport komponensek ( $Q_A$ ,  $Q_B$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ), amelyek még szobahőmérsékleten is képesek viszonylag hosszú ideig tárolni a pozitív, illetve a negatív töltést. Ez még inkább igaz alacsony hőmérsékleten történő gerjesztés esetén. Ilyenkor azonban bizonyos távolabbi töltésszétválasztási lépések gátlódnak és a töltések az elektrontranszportlánc P680-hoz közelebb elhelyezkedő komponensein tárolódnak. A rendszer hőmérsékletének növekedésével nő a valószínűsége annak, hogy a környezet hőenergiája segítségével töltésrekombináció következzen be a különböző, pozitív  $S$  állapotok vagy más donorok (tirozin  $Z^+$ , tirozin  $D^+$ , stb.) és a negatívan töltött akceptorok között. A csapdázódott pozitív ill. negatív töltések az energiagátat legyőzve visszavándorolnak a reakciócentrum klorofillhoz, ahol a töltésrekombináció bekövetkezik, a reakciócentrum gerjesztődik, a fellépő gerjesztési energia elvándorol az antenna klorofilokhoz, ahol vagy hővé alakul, vagy pedig fény formájában kisugárzódik a környezetbe (lumineszcencia).

Fotoszintetizáló szervezetekben jelenleg több, mint 10 TL sáv jelenlétét írták le, melyek közül többnek az eredete is ismert (részletesen ld. Vass és Inoue, 1992; Ducruet, 2003).

Algák, intakt levelek és izolált kloroplasztiszok két fő TL sávja az ún. Q- és B-sávok (Sane és Rutherford, 1986; Demeter és Govindjee, 1989). A B-sáv a vízbontó rendszer pozitívan töltött  $S_2$  ill.  $S_3$  állapotának és a negatívan töltött másodlagos kinon akceptor, a  $Q_B^-$  töltésrekombinációjának az eredménye. A Q-sáv az  $S_2$  és a  $Q_A^-$  közötti töltésrekombinációból származik. A sávok amplitúdója (ill. területe) arányos a mintában lévő  $S_2/S_3Q_B^-$  és  $S_2Q_A^-$  redox párok fényindukált töltésszeparáció utáni mennyiségével. Újabban olyan termolumineszcenciás sávok is ismertté váltak, melyek nem a fotoszintetikus elektrontranszportlánc töltéshordozóinak rekombinációjából, hanem lipidperoxidációs termékek és klorofillmolekulák közti energiaátadásból erednek (Hideg és Vass, 1993). Ezek a sávok magas hőmérsékleten (75-120 °C) jelentkeznek, a pontos csúcshőmérséklet valószínűleg függ a minta minőségétől és a fűtési sebességtől is (Stallaert és mtsai., 1995; Vavilin és Ducruet, 1998; Ducruet és Vavilin, 1999).

Sötétadaptált mintát alacsony, de fagypont feletti hőmérsékleten (0-5 °C körül) távoli vörös fénnel megvilágítva, majd a mintát fokozatosan felmelegítve egy 45 °C maximumhőmérséklettel ( $T_{max}$ ) jellemezhető ún. AG (*afterglow*) TL sávot kapunk. A sáv feltehetően egy a plasztokinon pool-on átmenő reverz elektronáram és az  $S_2/S_3$ -állapotok

töltésrekombinációjából eredhet (Ducruet és Miranda, 1992; Miranda és Ducruet, 1995a; Ducruet és mtsai., 2005a).

Más hasonló elven működő optikai módszerekhez képest, mint pl. a fluoreszcencia indukció, a termolumineszcencia gyakorlati alkalmazása kevésbé elterjedt, mérése rendszerint „házi” fejlesztésű és építésű készülékekkel történik. Ennek oka nagyrészt abban keresendő, hogy a mérés során szükséges mintakezelés (hűtés-fűtés) olyan rendszert igényel, mely nehézkessé teszi a hordozható, vagy legalábbis viszonylag könnyen szállítható készülékek előállítását. A hagyományosan folyékony nitrogént használó berendezések Peltier-elemmel történő kiváltása megoldás lehet a problémára (Ducruet, 2003). A módszer a fluoreszcencia indukcióval szemben azt az előnyt rejti magában, hogy az egyes elektrontranszportlánc komponensek közvetlenebbül követhetők nyomon, másrészt pl. a magas hőmérsékletű sávok vizsgálatával olyan stresszelt növények is szóra bírhatók, amelyek fluoreszcencia indukcióval már nem vizsgálhatók.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Növényi anyagok

A kukoricával (*Zea mays* L.) végzett vizsgálatokhoz leggyakrabban Norma hibridet használtunk. Az összehasonlító vizsgálatokhoz a termolumineszcenciás kísérletekben Mo 17 hidegérzékeny és CM 7 hidegtűrő, az antioxidánsokkal kapcsolatos kísérletekben 9 beltenyésztett vonalat (L1-9 kódjelűek), valamint ezek hibridjeit [(H1: L5xL7, H2: L3xL4, H3: L5xL2, H4: L1xL2, H5: (L8xL9)xL4, H6: L5xL6)] használtuk.

A tápoldatban végzett kísérletekhez a szemeket 30 percig 0,5%-os Neomagnol oldatban fertőtlenítettük, majd desztillált vízzel nedvesített szűrőpapírban csíráztattuk 3 napig 26°C-on. A növényeket a martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézet fitotronjában neveltük a következő összetételű módosított Hoagland-tápoldaton. Makroelemek: 0,3125 mM KNO<sub>3</sub>, 0,45 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,0625 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,125 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Mikroelemek: 11,92 μM HBO<sub>3</sub>, 4,57 μM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,191 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,08 μM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,024 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 15,02 μM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 23,04 μM Na<sub>2</sub>EDTA·5H<sub>2</sub>O.

A talajban végzett kísérletekhez a növényeket kukorica, borsó (*Pisum sativum* L.), uborka (*Cucumis sativus* L. cv. Marketer), tök, dohány (*Nicotiana tabacum* L.) és lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) esetében közvetlenül, a különböző kalászos gabonafélékkel végzett vizsgálatok esetében vagy közvetlenül, vagy előzetesen szűrőpapíron történő csíráztatás után kerti föld: Vegasca: homok 3:1:1 arányú keverékét tartalmazó földbe ültettük (fajok, fajták összehasonlítására szolgáló fagyállósági-teszt kísérletek). A felhasznált genotípusok: Chinese Spring, tavaszi, Cheyenne, Mv Magvas, Bánkúti 1201, Mv Emese őszi búzafajták (*Triticum aestivum* L.), Chinese Spring/Cheyenne 5A, Chinese Spring/Cheyenne 5D kromoszóma-szubstitúciós vonalak; Gerald őszi zab (*Avena sativa* L.), Presto tritikálé, Motto őszi rozs (*Secale cereale* L.), Hardy őszi árpa (*Hordeum vulgare* L.) és Martondur 1 durum búza. A futómuskátlik (*Pelargonium peltatum* L.) laboratóriumi, a paradicsomok (*Lycopersicon esculentum*, ill. *Lycopersicon pennellii*) üvegházi körülmények közt nőttek. A kukoricanövényeket rendszerint 22/20 °C-on 16/8 órás fény-sötét periódus mellett neveltük Conviron PGR-15 típusú növénynevelő kamrában (Controlled Environments Ltd, Winnipeg, Kanada) 2-3 hetes korig. A megvilágítás mértéke 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPFD, a relatív páratartalom 75% volt. Ahol a körülmények ettől eltértek, azt az adott kísérlet leírásakor jelzem. Az egyes vizsgálatok rendszerint a fényperiódus középső szakaszában történtek. A különböző

kísérletekhez használt növények nevelése, ill. a hidegkezelések és a patogénfertőzés körülményei részletesen szintén az egyes kísérletek leírásánál szerepelnek.

A szalicilsav és egyéb fenolszármazékok hatásának vizsgálatához a kéthetes növénykéek tápoldatához 0,5 mM koncentrációban adtuk az egyes kísérletekben leírt vegyületeket. A tápoldatot 1 nap után lecseréltük a nevelési tápoldatra és vizsgáltuk a kukorica növények hidegtűrését. A hidegtűrés tanulmányozásához a növényeket 5°C-ra helyeztük állandó megvilágítás mellett. Az alacsony hőmérsékleti kezelések vagy szintén Conviron PGR-15, vagy Conviron PGV-36 típusú növénynevelő kamrában, a búzanövények fagyasztása és fagytesztelése részben egy korábban Veisz és mtsai. (1997) által leírt módon, vagy fagyasztószekrényben (National Lab, Mölln, Németország) az adott kísérletnél leírt módon történt.

### **3.2. Az ionkiáramlás mérése**

A legutolsó teljesen kifejlett kukoricalevélből 0,8 cm átmérőjű korongokat vágunk. 2 ml szűrt desztillált (MilliQ) vízbe helyeztünk két levéldarabot, majd 60 perces enyhe rázatás után Automatic Seed Analyzer berendezéssel (ASA610, Agro Science Inc. USA) megmértük az oldat konduktivitását (Szalai és mtsai., 1996) A 100%-os destrukció mértékét a levéldarabkák 1 napig történő -80°C-os fagyasztása után mért konduktivitási adatokkal határoztuk meg.

### **3.3. A klorofill-a fluoreszcencia indukció mérése**

A növények klorofill fluoreszcencia indukciós paramétereit a legfiatalabb teljesen kifejlett levélen mértük PAM-2000, ill. PAM 101, 103 fluorométerekkel (Walz, Effeltrich, Németország) az egyes kísérletekben megadott hőmérsékleteken. A növényeket a mérés előtt 30 percig sötétben tartottuk. A maximális fluoreszcencia meghatározása PPFD = 3000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  értéket meghaladó, 0,8 s időtartamú fehér fényű felvillanással történt. A kiértékeléshez DA-2000 mérőprogramot használtunk. A klorofill fluoreszcencia indukciós paraméterek esetében a van Kooten és Snel (1990) által leírt nomenklatúrát követtük.

### **3.4. Termolumineszcencia mérések**

Mivel termolumineszcencia-mérő készülék kereskedelmi forgalomban egyelőre nem kapható, a növények TL mérése házi készítésű ún. "compact" TL-berendezéssel történt (Miranda és Ducruet, 1995a). A méréshez Hamamatsu H5701-02 fotoelektronsokszorozót használtunk, a hőmérsékletszabályozás dupla Peltier-vel (Marlow) történt. A mérések előtt a növényeket legalább 2 órán keresztül sötétadaptáltuk, a levelekből korongokat vagy csíkokat vágunk úgy, hogy a 25 mm átmérőjű mintatartót lefedje. A megnedvesített mintát (0,1 ml desztillált víz) Pyrex ablak és gumigyűrű zárta. Minden műveletet vagy teljesen sötétben, vagy rendkívül gyenge zöld fény ( $\text{PPFD} < 0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mellett végeztünk. A mintabehelyezést általában egy rövid, 1 perces adaptációs fázis, majd az egyes kísérletekben leírt kezelés ill. megvilágítás követte. A távoli vörös fénnel történő gerjesztéshez a PAM-102 egységgel (Walz, Effeltrich, Németország) működő 102-FR (Walz, Effeltrich, Németország) távoli vörös LED-fényforrást használtuk, melynek maximuma 735 nm-nél van. Az egy elektronátmenetet biztosító fényfelvillanáshoz a PAM101-103 készülékhez tartozó XST *single turnover flash* lámpát használtuk.

### **3.5. P700 mérések**

A P700<sup>+</sup> redukciójának kinetikáját PAM-100 fluorométerhez csatlakozó ED-P700DW-E feltételt követtük nyomon (Schreiber és mtsai., 1988; Ducruet és mtsai., 2005b) szobahőmérsékleten. A re-redukció kinetikájának elemzését MATLAB szoftverrel végeztük (MATLAB, 2006). A görbeillesztés Steiglitz-McBride módszerrel történt (Steiglitz és McBride, 1965).

### **3.6. Az enzimaktivitások meghatározása**

#### **3.6.1. Enzimkivonás**

0,5 g növényi anyagot 0,5 g kvarchomokkal dörzsöltünk el 2,5 ml jéghideg 3 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot és 1 mM EDTA-t tartalmazó 0,5 mM TRIS-HCl puffer (pH 7,5) hozzáadásával mélyhűtött dörzsmozsárban 4°C-on. A homogenizátumot hűtött centrifugában 20 percig centrifugáltuk 12000 g-vel. A felülúszót Eppendorf csövekbe osztottuk szét. Az

enzimvizsgálatok egy részét a kivonás után azonnal, a friss mintából végeztük (általában a GR enzimhez), más részükhöz a kivonatot mérésig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az össz-enzimaktivitásokat fotometriásan határoztuk meg (Shimadzu UV-VIS 160A), kivéve a kataláz enzim szalicilsav-gátlásának vizsgálatát, melyhez oxigénelektrodot (CB1D, Hansatech Ltd., UK) használtunk. Mérésig a mintákat jégen tartottuk, a méréseket szobahőmérsékleten végeztük.

### 3.6.2. Kataláz

A kataláz (EC 1.11.1.6) aktivitását 240 nm-en mértük, a hidrogén-peroxid fogyását követve nyomon. A reakcióelegy össztérfogata 3 ml volt, és 0,5 mM TRIS pufferben (pH 7,4) 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t és 50  $\mu\text{l}$  növényi mintát tartalmazott (Ádám és mtsai., 1995).

A kataláz enzim szalicilsavval történő gátlását oxigénelektrod segítségével vizsgáltuk az oxigénfejlődés alapján. Erre azért volt szükség, mert a fotometriás mérést lehetetlenné teszi a szalicilsav jelentős abszorbanciája 240 nm-en. A mérés 20 mM citrát-pufferben (pH 6,5), 5 mM  $\text{MgSO}_4$  és 1 mM EDTA jelenlétében történt (Sánchez-Casas és Klessig, 1994). A 3 ml reakcióelegy 50  $\mu\text{l}$  növényi mintát tartalmazott. A hidrogén-peroxid koncentrációja 1 mM és 100 mM között változott az enzimkinetikai mérések során. A szalicilsav koncentrációja 0,25 és 4 mM között változott.

### 3.6.3. Gvajakol-peroxidáz

A POD (EC 1. 11.1.7) aktivitását Ádám és mtsai (1995) módszere szerint határoztuk meg. A gvajakol oxidációja nyomán bekövetkező abszorbancia-növekedést 470 nm-en mértük. A reakcióelegy 3 ml-éhez 50  $\mu\text{l}$  mintát adtunk. A reakcióelegy 0,1 mM acetát (pH 5,5) pufferben 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot, és 1 mM gvajakolt tartalmazott.

### 3.6.4. Aszkorbát-peroxidáz

Az APX (EC 1.11.1.11) aktivitását 25 mM aszkorbinsavat és 0,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot tartalmazó TRIS pufferben (0,2 mM pH 7,8) mértük. A reakcióelegy 2,25 ml volt, melyhez 50  $\mu\text{l}$  mintát adtunk. Az aszkorbinsav fogyását 290 nm-en követtük nyomon (Nakano és Asada, 1987).

### *3.6.5. Glutation-reduktáz*

A GR (EC 1.6.4.2) aktivitásának meghatározásakor a 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoésav) (DTNB) redukcióját mértük 412 nm-en, melyet az enzimműködés során keletkezett GSH okozott. A reakcióelegy összetétele: 0,1 M foszfát puffer (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,75 mM DTNB, 0,1 mM NADPH, 1 mM GSSG (Smith és mtsai., 1988). A reakcióelegy 1 ml össztérfogata 50 µl mintát tartalmazott.

### *3.6.6. Glutation-S-transzferáz*

A GST (EC 2.5.1.18) enzim aktivitásának meghatározásához 72,7 mM Na-foszfát puffer (pH 6,5), 3,6 mM redukált glutation, 1 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzén és enzimkivonat (3 ml reakcióelegyben 50 µl) elegyének abszorbancianövekedését követtük nyomon 340 nm-en (Mannervik és Guthenberg, 1981).

### *3.6.7. Szuperoxid-dizmutáz*

A SOD (EC 1.15.1.1) enzimek fotometriás összaktivitás-meghatározása a nitro-blue-tetrazolium (NBT) fotokémiai redukciójának gátlásán alapult a Beauchamp és Fridovich (1971) által leírt módszer Yordanova és mtsai. (2004) szerinti módosításait követve. Eszerint 0,5 g növényi mintát négyszeres mennyiségű (w/v) jéghideg pufferben (0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,1mM EDTA, 0,05% Triton X-100) homogenizáltunk és centrifugáltunk 4 °C-on 30 percig 15.000 g mellett. Az aspecifikus reakciók elkerülése végett a felülúszót 24 órán keresztül feles, Triton-X mentes kivonóban dializáltuk. A reakcióelegy az enzimkivonat mellett 50 mM foszfát puffert (pH 7,8), 0,053 mM NBT-t, 10 mM metionint és 0,0053 mM riboflavint tartalmazott. A reakció indítása fénnel történt, és kb. 7 percig zajlott. A redukált NBT mennyiségének meghatározása 560 nm-en történt.

### *3.6.8. Peroxidáz izoenzimek kimutatása gélelektroforézissel*

A peroxidáz izoenzimeket 10 %-os nem-denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el (15 mA, 4 óra, 4 °C). Az izoenzimek láthatóvá tételéhez a géleket 15 percig festettük 0,68 mM

benzidint, 5,5 mM gvajakolt, 0,63 mM MnCl<sub>2</sub>-ot, és 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot tartalmazó 0,2 M acetát pufferben (pH 5,5).

### **3.7. Fehérjetartalom-meghatározás**

A minták összfehérje koncentrációját Bradford (1976) módszerén alapuló Bio-Rad reagenssel határoztuk meg, spektrofotométerben 595 nm-en mérve a reakcióelegy abszorbanciáját.

### **3.8. Lipidanalízis**

A vizsgált lipidek kivonása Bligh és Dyer (1959) módszerével 1 g, folyékony nitrogénben 5 ml kloroform:metanol 1:2 arányú keverékével (v/v) eldörzsölt növényi anyagból kiindulva, történt. A különböző lipidosztályokat szilikagél vékonyrétegen különítettük el (Pham-Quoc és mtsai., 1994). A zsírsav-etilészterek elválasztása Shimadzu GCMS-QP2010 (Shimadzu Co., Kyoto, Japán) GC/MS készülék, az adatfeldolgozás GCMS 2.10 szoftver, a kettőskötés index számolása  $DBI = 1x(\%18:1)+2x(\%18:2)+3x(\%18:3)$  segítségével történt.

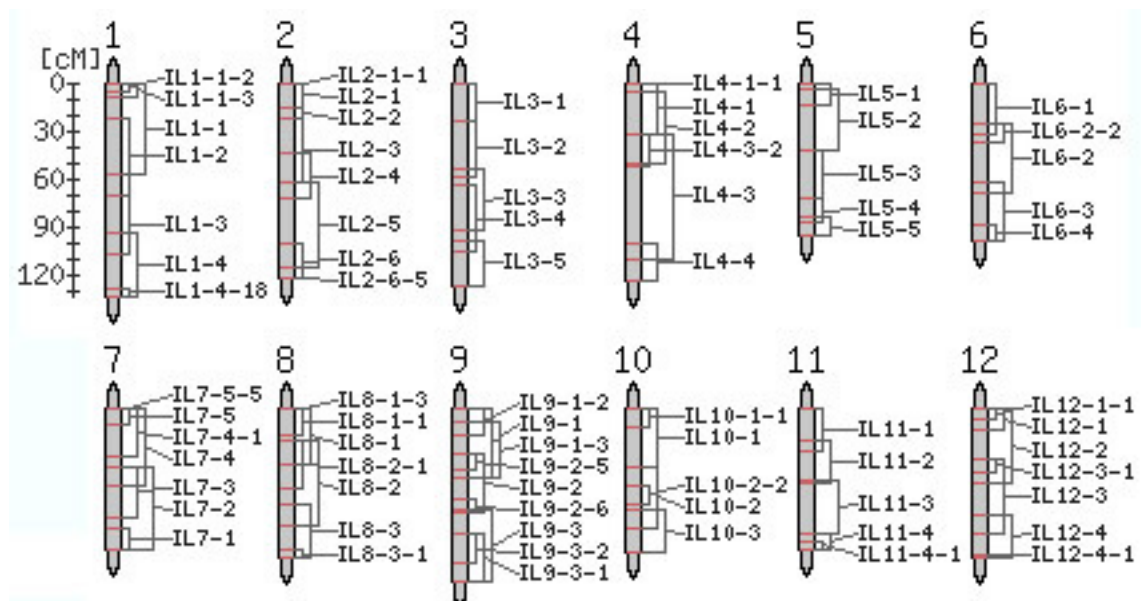
### **3.9. Szalicilsav-meghatározás**

A szalicilsav és o-hidroxi-fahéjsav (oHCA) kimutatása és mennyiségi meghatározása magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC; Waters, USA) Meuwly és Métraux (1993) által leírt módszerének módosított változatával (Pál és mtsai., 2005) történt 1,5 g levélből kiindulva 70, majd 90 %-os metanolos extrakciót követően, o-aniziksavat belső standardként és p-hidroxi-benzoésavat mint extrakciós hordozót használva. Detektáláshoz diódasoros UV/VIS detektort, valamint fluoreszcens detektorokat használtunk.

### **3.10. A *LeApx1* gén térképezése**

A *LeApx1* gén térképezéséhez *Lycopersicon esculentum* és *L. pennellii* paradicsomfajokból, valamint különböző introgressziós vonalakból (Eshed és Zamir, 1994, 1995; **3. ábra**) DNS-t izoláltunk (Nucleospin Plant kit, Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Németország).





**3. ábra.** *L. pennellii* kromoszómaszegmensei *L. esculentum* introgressziós vonalakban. Forrás: [http://www.sgn.cornell.edu/cview/map.pl?map\\_id=il6&show\\_offsets=1&show\\_ruler=1](http://www.sgn.cornell.edu/cview/map.pl?map_id=il6&show_offsets=1&show_ruler=1)

A megfelelő génszakasz amplifikálásához használt primerek:

f: 5'-CTTATCGCATTTCATTCTGCTTCTTCAG-3',

r: 5'-AAGGGAACATCAGGTCCTCCAGTAACTTCA-3'.

A PCR termékek kimutatása 2 %-os agaróz gélen etidium-bromidos festéssel történt.

### 3.11. Statisztikai kiértékelés

Az adatok általában 5 mérés átlagát tükrözik. Ahol ettől eltértünk, ott az adatok bemutatásánál jeleztem. A szignifikáns különbség meghatározásához általában *Student*-féle kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Egyes fagyállósági tesztekben a legkisebb szignifikáns különbség meghatározása variancia-analízissel (ANOVA) történt. A termolumineszcencia bemutatásához reprezentatív görbéket mutattunk be.

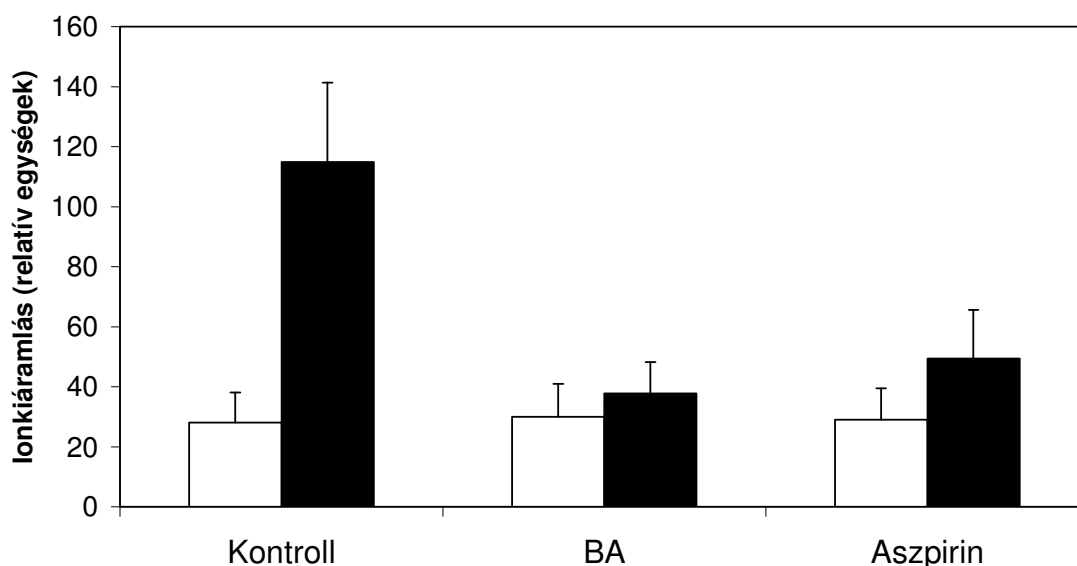
## 4. Eredmények

### *4.1 Szalicilsav és származékainak hatása fiatal kukoricanövények stresszélettani paramétereire*

Korábbi vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy szalicilsavval történő előkezelés (megfelelő koncentrációban a növényneveléshez használt tápoldathoz adagolással) segítségével fiatal kukoricanövények hidegtűrését fokozni lehet (Janda és mtsai., 1997, 1999a; Szalai., 1997a). Kimutattuk továbbá, hogy a szalicilsav kezelés együtt jár egyes antioxidáns enzimek aktivitásának változásával: 1 napos 0,5 mM szalicilsav előkezelés hatására a kataláz enzim aktivitása lecsökkent, a POD és GR enzimek aktivitása megnőtt. A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a hidegtűrést fokozó hatást milyen más, a szalicilsavval rokon vegyülettel lehet elérni.

#### *4.1.1 Szalicilsav egyes rokon vegyületeinek hatása fiatal kukoricanövények hidegtűrőképességére*

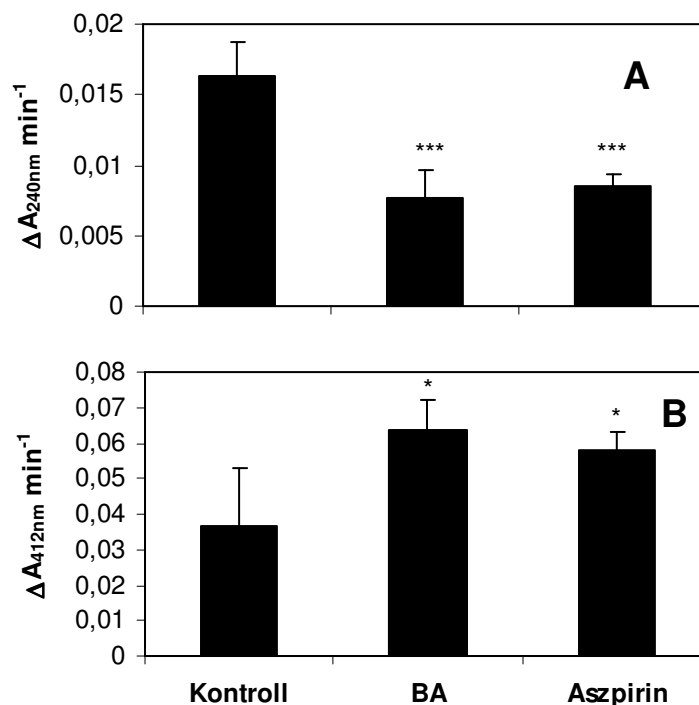
Az első kísérletsorozatban a tápoldatban kontroll körülmények közt (22/20 °C) nevelt kukoricanövényeket 1 napig 0,5 mM benzooesavval ill. aszpirinnel (acetil-szalicilsav) kezeltük, majd 2 °C-os alacsony hőmérsékleti stressznek tettük ki őket. Ezen a hőmérsékleten a kontroll növények már 1 nap után is jelentős károsodást szenvedtek: jól látható volt a levelek fonnyadása, amit később nekrotizációs tünetek megjelenése követett, végül a növények elpusztultak. Azokon a növényeken, amelyek előzetesen benzooesav vagy aszpirin előkezelést kaptak, ezek a tünetek lényegesen később, ill. sokkal mérsékeltebben jelentek meg: még 3 nap hidegstressz után is ugyanúgy, mint a hidegkezelés előtt, egészségesnek látszottak, lankadás nem volt megfigyelhető. A megfigyelések kvantifikálására 3 nap hidegstressz után ionkiáramlás-méréseket végeztünk (**4. ábra**).



**4. ábra.** Egy napos 22/20 °C-os nevelési hőmérsékleten végzett 0,5 mM benzoészav (BA) ill. aszpirin előkezelés hatása az azt követő 3 napos 2°C-os hidegstressz utáni elektrolitkiáramlásra két hetes fiatal kukoricánövényekben. Fehér oszlop: hidegstressz előtt, fekete oszlop: hidegstressz után. A mérések a növények legfiatalabb, de teljesen kifejtett levelein történtek (n=10;  $\pm$ SD).

Az adatokból is jól látszik, hogy mind a benzoészav, mind az aszpirin előkezelés jelentős védelmet nyújtott a hidegstressz ellen. A későbbi vizsgálataink során egy másik rokon vegyületről, az o-hidroxifahéjsavról (oHCA) is bebizonyosodott, hogy hasonló módon alkalmazva védelmet nyújt a hidegstressz ellen (Horváth és mtsai., 2002). Ezzel szemben bizonyos vegyületek, mint pl. a szulfo-szalícilsav, vagy a p-hidroxibenzoészav hatástalannak bizonyultak (adatok nincsenek bemutatva).

Az antioxidáns enzimek szerepének vizsgálatához a kataláz és a GR enzimek aktivitását mértük az egy napos előkezelés után. A **5. ábrán** látszik, hogy a korábban kimutatott szalicilsav hatáshoz hasonlóan (Janda és mtsai., 1997, 1999a Szalai és mtsai., 1997a) a 0,5 mM benzoészav vagy 0,5 mM aszpirin előkezelés is csökkentette a kataláz, és növelte a GR aktivitását. Mindezek mellett a szalicilsavhoz hasonlóan 0,5 mM aszpirin- és benzoészav-kezelés esetében is sikerült natív gélelektroforézis segítségével egy új peroxidáz izoenzim megjelenését kimutatnunk (gélkép nincs mutatva). Feltehető, hogy a kimutatott GR- és POD- aktivitás emelkedés hozzájárul a megnövekedett hidegtűréshez is.



**5. ábra.** Egy napos 22/20 °C-os nevelési hőmérsékleten végzett 0,5 mM benzoészav (BA) ill. aszpirin előkezelés hatása fiatal kukoricanövények kataláz (A) és GR (B) enzimek aktivitására. A mérések a növények legfiatalabb, de teljesen kifejlett levelein történtek (n=5;  $\pm$ SD).

#### 4.1.2 Szalicilsav és rokon vegyületeinek katalázgátló hatásának vizsgálata *in vitro*

A szalicilsav katalázgátló hatására vonatkozólag több ellentmondó adat található az irodalomban. Ennek tisztázására az előbb bemutatott, intakt növényeken végzett vizsgálatok mellett *in vitro* rendszerekben is tanulmányoztuk kukoricában a szalicilsav és rokon vegyületeinek a kataláz enzimre gyakorolt hatását. Már a kezdeti, teljes levélkivonatokon végzett kísérletek is azt mutatták, hogy a szalicilsav kukorica esetében is képes gátolni a kataláz enzim aktivitását (Janda és mtsai., 1997). Ezen vizsgálatok a későbbiekben PhD-hallgatóm, Horváth Eszter PhD téziseinek alapjait képezte (Horváth, 2002; 2004), így ezeket az eredményeket jelen dolgozatban már csak vázlatosan ismertetem:

Eredményeink igazolták, hogy a kukorica kataláz izoenzimeit különböző módon és mértékben gátlódnak szalicilsav hatására.

- A kataláz1 izoenzimet nem-kompetitív módon, a kataláz2-t pedig kompetitíven és kisebb mértékben gátolta a szalicilsav. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a szalicilsav hatása szövetspecifikus lehet a kataláz izoenzimek előfordulása szerint.

- A benzoésav, az acetyl-szalicilsav és az o-hidroxi-fahéjsav a szalicilsavhoz hasonlóan jelentős mértékben gátolta a kataláz1 aktivitását, a kataláz2-t viszont csak kisebb mértékben. A 4-hidroxi-benzoésav azonban mindkét izoenzimet csak kis mértékben és kompetitíven gátolta. Azok a vizsgált vegyületek, melyek a kataláz1 aktivitását nagymértékben gátolták, képesek voltak a kukorica hidegtűrését fokozni. A kataláz1 enzimnek szerepe lehet a hidegtűrés indukciójában.

#### *4.1.3. Szalicilsav és származékainak hatása fiatal kukoricanövények egyes fotoszintetikus paramétereire és növekedésére*

Az antioxidáns enzimek mellett vizsgáltuk az 1 napos, normál hőmérsékleten történő előkezelés hatását az egyes gázcsere, valamint a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működéséről felvilágosítást adó klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterekre. Az adatokból látszik (**1. táblázat**), hogy mind a benzoésav-, mind az aszpirinkezelés szignifikánsan csökkentette a nettó fotoszintetikus aktivitást. Ez együtt járt a gázcsere nyílások zártságának fokozódásával, az ebből eredő transpiráció-csökkenéssel, valamint az intercelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció (C<sub>i</sub>) csökkenésével is.

A fluoreszcencia indukciós paraméterek közül a PS2 maximális kvantumhatásfokát jelző F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> paraméter nem változott (sem az F<sub>o</sub>, sem az F<sub>m</sub> paraméterek nem változtak), az aktuális kvantumhatásfok [(F<sub>m</sub>'-F<sub>s</sub>)/F<sub>m</sub>'], valamint a fotokémiai kioltás (q<sub>p</sub>) csak igen kismértékben, az esetek zömében statisztikailag nem szignifikánsan csökkent, a nem-fotokémiai kioltás (q<sub>N</sub>) mértéke viszont jelentősen, benzoésav kezelésre is több, mint kétszeresére, aszpirin esetében pedig csaknem háromszorosára nőtt (**2. táblázat**).

**1. táblázat.** Különböző gázcsere-paraméterek [nettó fotoszintézis,  $P_N$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), sztómakonduktivitás,  $g_s$  ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiráció,  $E$  ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) és intercelluláris  $\text{CO}_2$  cc.,  $C_i$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  levegő) változása 1 nap 0,5 mM szalicilsav, aszpirin vagy benzoésav kezelés hatására. A mérések 22 °C-on  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PPFD mellett történtek. Az eredmények 5 mérés átlagát tükrözik. ns: nem szignifikáns, \*, \*\*, \*\*\*: szignifikáns  $p < 0,05$ ; 0,01; illetve 0,001 szinten.

Kezelés	$P_N$	$g_s$	$E$	$C_i$
<b>Kontroll</b>	$10,6 \pm 0,6$	$0,108 \pm 0,023$	$1,229 \pm 0,252$	$194 \pm 26$
<b>Szalicilsav</b>	$7,9 \pm 1,4^{***}$	$0,058 \pm 0,012^{***}$	$0,759 \pm 0,127^{***}$	$139 \pm 12^{***}$
<b>Aszpirin</b>	$9,1 \pm 1,8^*$	$0,065 \pm 0,019^{***}$	$0,871 \pm 0,240^{***}$	$124 \pm 23^{***}$
<b>Benzoésav</b>	$9,4 \pm 0,6^{***}$	$0,072 \pm 0,017^{**}$	$0,986 \pm 0,268^{**}$	$138 \pm 24^{***}$

**2. táblázat.** Különböző klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterek változása 1 nap 0,5 mM szalicilsav, aszpirin vagy benzoésav kezelés hatására. Az  $(F'_m - F_s)/F'_m$  paraméter meghatározása 22 °C-on  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PPFD mellett, az  $F_v/F_m$  paraméteré pedig 30 perc sötétadaptálás után történt. Az eredmények 5 mérés átlagát tükrözik. ns: nem szignifikáns, \*, \*\*, \*\*\*: szignifikáns  $p < 0,05$ ; 0,01; illetve 0,001 szinten.

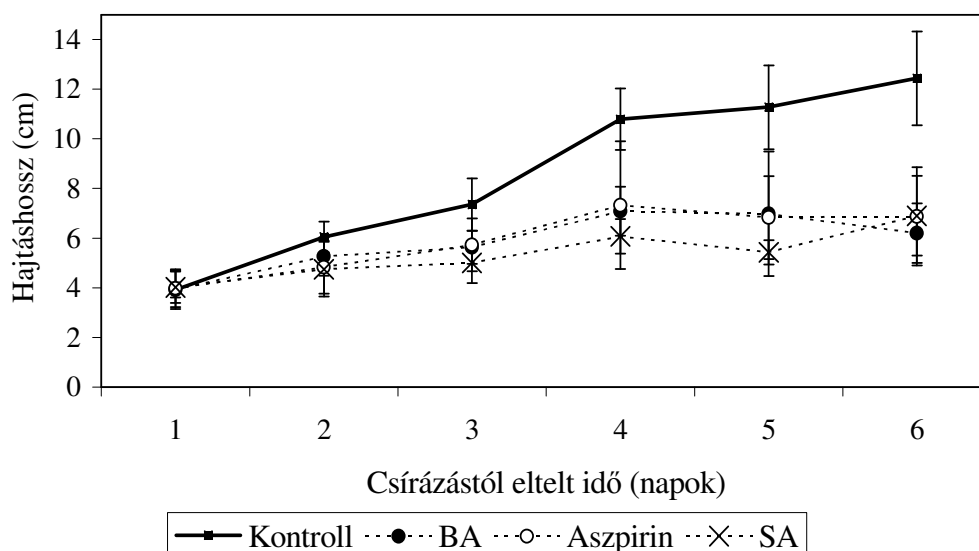
Kezelés	$F_v/F_m$	$(F'_m - F_s)/F'_m$	$q_p$	$q_N$
<b>Kontroll</b>	$0,769 \pm 0,005$	$0,652 \pm 0,006$	$0,917 \pm 0,011$	$0,154 \pm 0,009$
<b>Szalicilsav</b>	$0,763 \pm 0,013$	$0,596 \pm 0,091$	$0,863 \pm 0,106$	$0,261 \pm 0,056^*$
<b>Aszpirin</b>	$0,781 \pm 0,005$	$0,595 \pm 0,056$	$0,906 \pm 0,012$	$0,428 \pm 0,132^*$
<b>Benzoésav</b>	$0,775 \pm 0,012$	$0,618 \pm 0,020^*$	$0,903 \pm 0,009$	$0,328 \pm 0,010^{***}$

A leveleknek 1 nap 0,5 mM szalicilsav-, benzoésav- ill. aszpirinkezelésre sem a klorofill-, sem a karotenoidtartalma nem változott szignifikánsan (**3. táblázat**).

**3. táblázat.** 1 napos 0,5 mM szalicilsav, aszpirin vagy benzoésav kezelés hatása fiatal kukoricanövények pigmenttartalmára ( $\mu\text{g}$  pigment  $\text{g}^{-1}$  friss tömeg) 22/20 °C-on. Az eredmények 5 mérés átlagát tükrözik.

Kezelés	Klorofill-a	Klorofill-b	Klorofill(a/b)	Karotenoid
<b>Kontroll</b>	1688 $\pm$ 286	459 $\pm$ 98	3,698 $\pm$ 0,149	426 $\pm$ 83
<b>Szalicilsav</b>	1941 $\pm$ 90	547 $\pm$ 33	3,552 $\pm$ 0,064	539 $\pm$ 36
<b>Aszpirin</b>	1922 $\pm$ 61	540 $\pm$ 18	3,558 $\pm$ 0,019	517 $\pm$ 36
<b>Benzoésav</b>	1636 $\pm$ 228	463 $\pm$ 69	3,536 $\pm$ 0,093	454 $\pm$ 58

Normál hőmérsékleten mind a benzoésav, mind az aszpirinkezelések hatására csökken a növekedés mértéke is. Ez a már több hetes növények esetében 1 napos kezelés hatására természetesen még nem szignifikáns, viszont ha a növényeket csírázástól benzoésav vagy aszpirintartalmú tápoldatban neveljük, a növekedésgátlás jól kimutatható (**6. ábra**). Szalicilsavnak ugyanebben a koncentrációban (0,5 mM), vagyis ahol a hidegtűrés-fokozást is elértük, hasonló hatását tapasztaltuk. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a hideg elleni védő hatásnak ára van: ugyanazon kezelés, amely jelentősen csökkenteni képes az alacsony hőmérséklet károsító hatásait, normál hőmérséklet mellett stresszként jelentkezik.

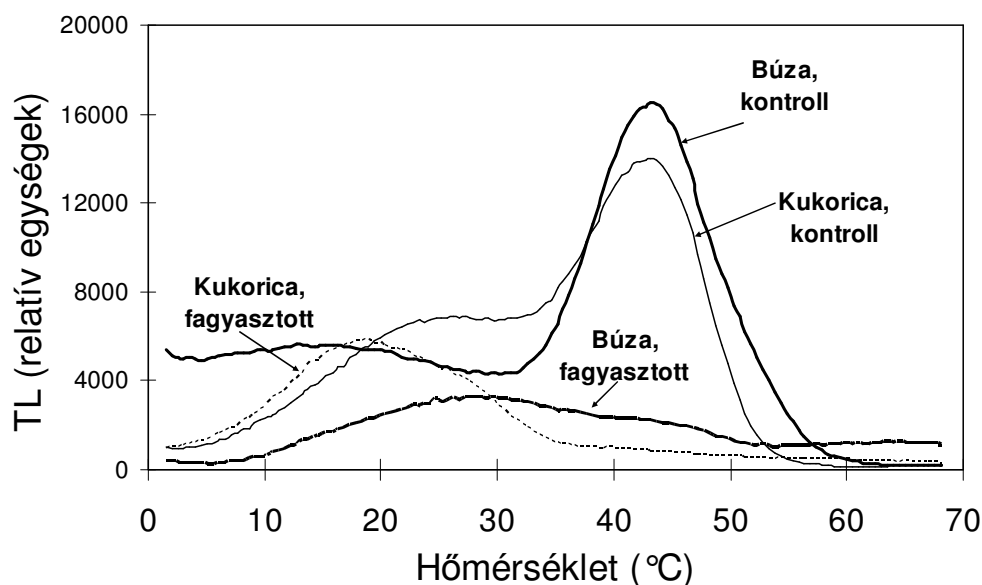


**6. ábra.** Fiatal kukoricanövények növekedése a csírázástól kezdve 22/20 °C-on normál (kontroll), vagy 0,5 mM szalicilsavat (SA), benzoésavat (BA) ill. aszpirint tartalmazó tápoldatban. A vizsgalandó anyagokat a 4 napos előcsíráztatást követően kapták a növények (0. nap).

## 4.2. Termolumineszcencia alkalmazása egyes abiotikus stresszfactorok hatásainak kimutatásában

### 4.2.1 Fagystressz

Az első kísérletekben az előzetes fagyasztás különböző TL komponensekre gyakorolt hatásait tanulmányoztuk búzában és kukoricában (7. *ábra*). A két faj távoli vörös fény által indukált TL görbéje már a kontroll körülmények között (20/18°C; PPFD = 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) lévő növényekben is jellegzetesen eltért: búzában a B-sáv  $T_{\text{max}}$  értéke jelentősen alacsonyabb hőmérsékleten (15-18 °C) volt, mint kukoricában (25 °C). Fagyasztás után búzában ez az érték a magasabb hőmérsékletek irányába (28-30 °C) tolódott, valószínűleg a fagyasztásra bekövetkező membránkárosodásból eredő protongradiens megszűnésének köszönhetően (Thomashow, 1998), hiszen mások szétkapcsolószerekkel hasonló hatást mutattak ki (Miranda és Ducruet, 1995a,b). A 40-45 °C körüli csúcshőmérséklettel jellemezhető AG-sáv búza növényekben fagyasztás után is kismértékben kimutatható volt, szemben a hidegérzékeny kukoricával, ahol az AG fagyasztás hatására teljesen eltűnt.



7. *ábra*. Két perces fagyasztás hatása a távoli vörös fénnel (30 s, 0 °C) indukálható termolumineszcencia (TL) görbére fiatal kukorica (Norma hibrid) és búza (Cheyenne) növényekben több, mint két órás sötétadaptáció után. A mérések a növények legfiatalabb, teljesen kifejlett levelein, közvetlenül a gerjesztést követően 0,5 °C s<sup>-1</sup> fűtési sebesség mellett történtek.



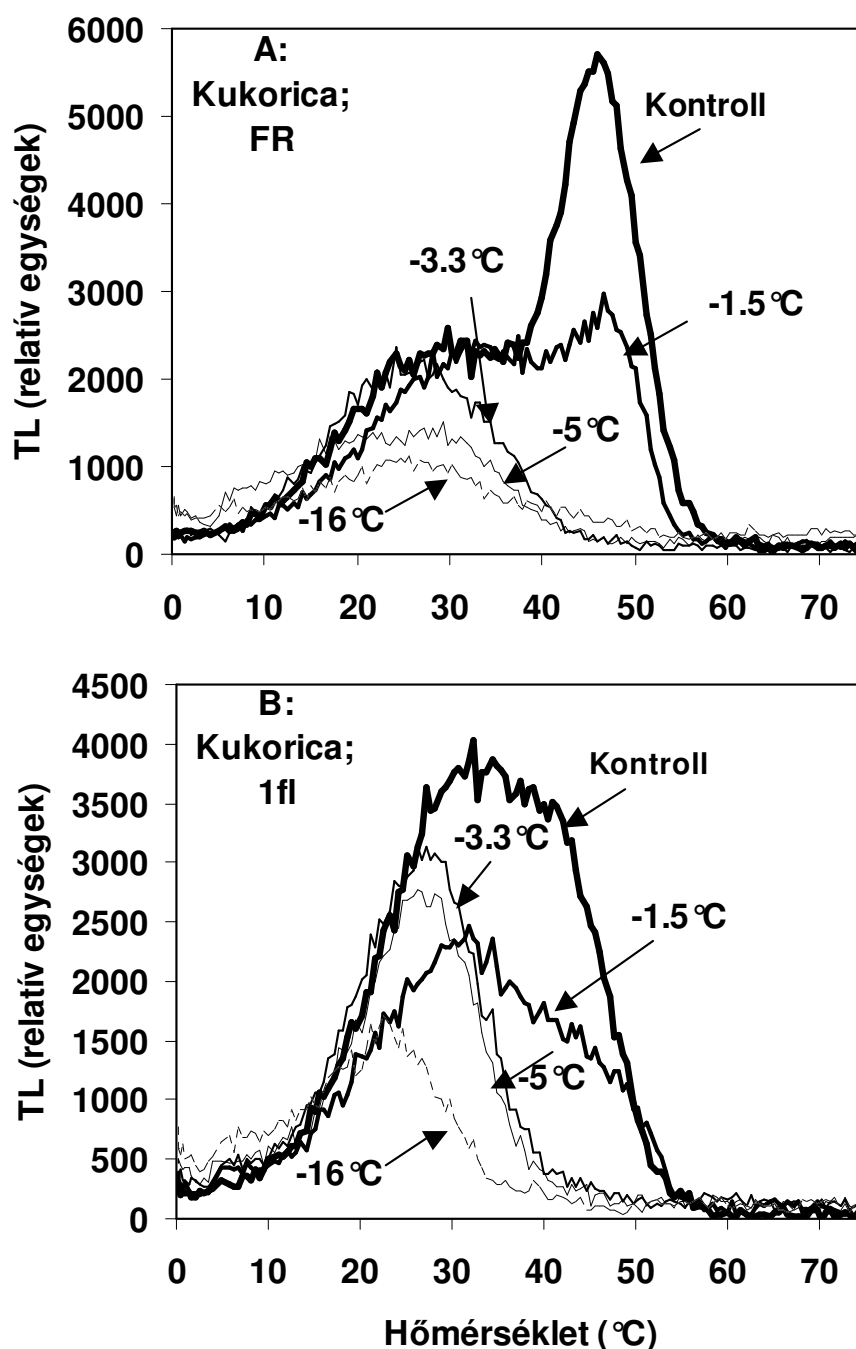
Az AG-sáv fagyasztási hőmérsékletfüggését vizsgálva azt kaptuk, hogy általában  $-5-6^{\circ}\text{C}$  kritikus hőmérséklet alatti fagyasztás mellett hirtelen következik be a sáv eltűnése. Őszi búzafajtákban alacsony hőmérsékleti edzéssel ez a kritikus hőmérséklet  $2-3^{\circ}\text{C}$ -kal csökkenhet ugyan, de szelekciós módszernek ennek a hőmérsékletek a vizsgálatát mégsem javasoljuk, mert az egyes fajták közti különbségek igen kicsik.

A következőkben a fenti megfigyelésekből kiindulva különböző növényfajokban behatóbban vizsgáltuk, hogy a TL görbe hogyan tükrözi a fagypont alatti hőmérséklet hatásait.

#### 4.2.1.1. Kukorica

Ahogy azt a **8A ábra** mutatja, fiatal kukoricanövények esetében már egy rövid idejű (2 perc)  $-1,5^{\circ}\text{C}$ -os fagyhatás is szignifikáns hatással van a távoli vörös fény (FR) által indukált TL görbére: az AG-sáv amplitúdója jelentősen lecsökken, csúcspozíciója a magasabb hőmérsékletek irányába tolódik. Alacsonyabb hőmérsékleti kezelések hatására az AG-sáv fokozatosan tovább csökken, ill.  $-3,3^{\circ}\text{C}$  alatt teljesen eltűnik. A FR indukálta B-sáv jelentősen alacsonyabb hőmérsékleti fagyasztás után kezdett csak csökkenni, mint az AG-sáv. Ez jól látszik abból, hogy  $-3,3^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztás után, mikor az AG-sáv már teljesen eltűnt, a B-sáv még nem változott. Azonban egy küszöbérték alatt (esetünkben  $-5^{\circ}\text{C}$ ) egy hirtelen amplitúdócsökkenés következett be, viszont szemben az AG-sávval, még jóval alacsonyabb hőmérsékletek mellett is detektálható volt.

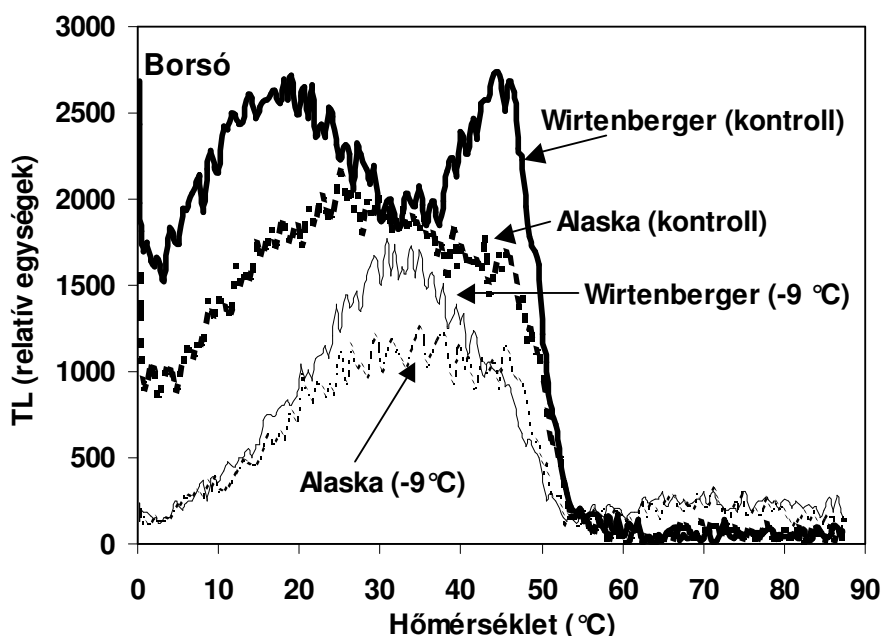
Zöld növényeket rövid idejű (egy elektronátmenetet megengedő ún. single turnover) fényfelvillanással (*flash*) gerjesztve elvileg az  $S_2/Q_B$  töltéssrekombinációból eredő B-sávot kapjuk (Demeter és Govindjee, 1989). Ez a sáv rendkívül „fagytoleráns”, hiszen igen alacsony,  $-80^{\circ}\text{C}$  vagy az alatti lehűtést követően is kimutatható. Intakt leveleket vizsgálva azonban azt kaptuk, hogy hasonlóan a távoli vörös fény által indukált TL sávokhoz, már rövid idejű, nem túl alacsony hőmérsékletű ( $-4-10^{\circ}\text{C}$ ) fagyasztás után is jelentős amplitúdócsökkenés következik be (**8B ábra**). Mindemelllett, a fagyasztási hőmérséklet függvényében egy jelentős csúcshőmérséklet-eltolódás is tapasztalható az alacsonyabb hőmérsékletek felé. Mindezek az eredmények azt sugallták, hogy intakt levelekben a *flash* gerjesztés egy összetett sávot eredményez, melynek magasabb hőmérsékleti komponense tulajdonképpen egy AG-sáv.



**8. ábra.** Rövid idejű (2 perc), különböző hőmérsékleteken végzett fagyasztás hatása fiatal Norma hibrid kukoricanövények **(A)** távoli vörös (FR) és **(B)** egy elektronátmenetet biztosító fényfelvillanás (1 fl) által indukált termolumineszcencia (TL) görbéjére. A fagyasztás közvetlenül a 0,3 °C-on alkalmazott gerjesztés előtt történt az ábrán jelzett hőmérsékleteken. A kontroll növények ugyanennyi ideig (2 perc) 0,3 °C-on maradtak. A mérések a növények legfiatalabb, teljesen kifejtett levelein, közvetlenül a gerjesztést követően 0,5 °C s<sup>-1</sup> fűtési sebesség mellett történtek.

#### 4.2.1.2. Borsó

Borsó növényekben a távoli vörös fény által indukált TL görbe viselkedése gyakorlatilag a búzáéval volt azonos: kontroll, nem fagyasztott növényekben a B-sáv csúcshőmérséklete viszonylag alacsony hőmérsékleten volt (15-20 °C), ami fagyasztás után felfelé (28-30°C) tolódott. Szemben a hidegérzékeny kukoricánövényekkel, ahol már -3,3 °C-os fagyasztást követően teljesen eltűnt az AG-sáv, a búzához hasonlóan a borsó növényekben is még ennél jóval alacsonyabb hőmérsékletű fagyasztás után is detektálható volt (9. ábra). A *flash* indukálta TL görbe viselkedése a kukoricával megegyező volt (a görbe nincs bemutatva).

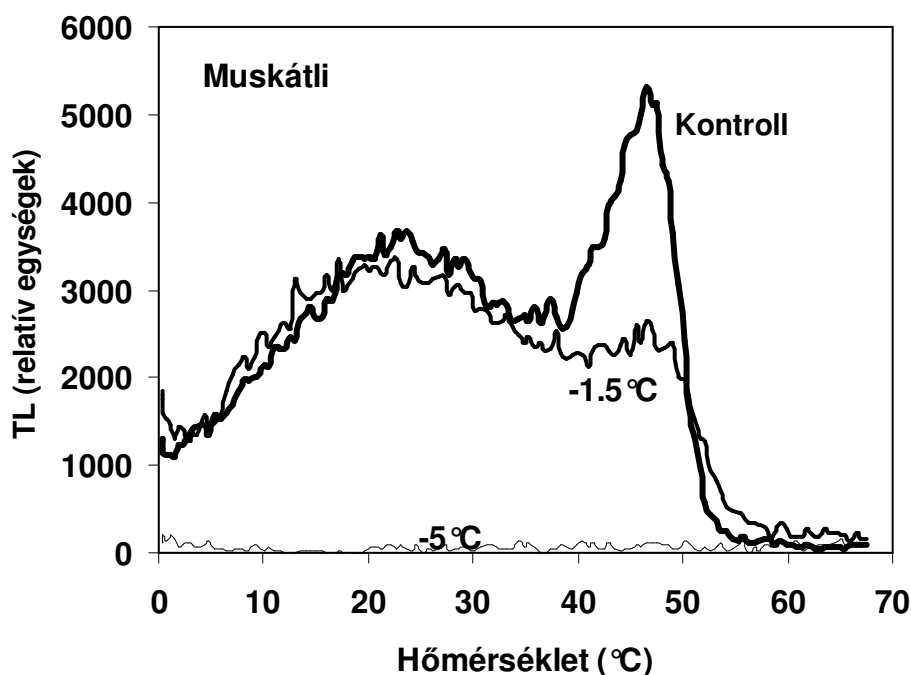


**9. ábra.** Rövid idejű (5 perc, -9 °C) fagyasztás hatása a távoli vörös fénnel (30 s, 0,3 °C) indukálható TL görbére 22/20 °C-on nevelt borsó (Wirtenberger és Kazar fajták) növényekben több, mint két órás sötétadaptáció után. A kontroll növények ugyanennyi ideig 0,3 °C-on maradtak. A mérések teljesen kifejlett, de még nem öregedő levelekből származó korongokon, közvetlenül a gerjesztést követően 0,5 °C s<sup>-1</sup> fűtési sebesség mellett történtek.

#### 4.2.1.3. Futómuskátli

Az általunk vizsgált növények közül a fagyasztásnak a futómuskátliban volt a legdrasztikusabb hatása. Akárcsak a kukorica esetében, a fagyasztási hőmérséklet függvényében

a FR indukálta AG-sáv amplitúdója fokozatosan csökkent, miközben a csúcshőmérséklet nőtt. Azonban szemben minden más vizsgált növényfajjal, amelyeknél még extrém alacsony hőmérséklet után is legalább a B-sáv detektálható volt, a futómuskátli esetében egy kb.  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os küszöbhőmérséklet alatt minden TL sáv eltűnt (**10. ábra**). Mindez igaz volt nemcsak a FR fénnel, hanem az *flash*-sel indukált TL komponensekre is.

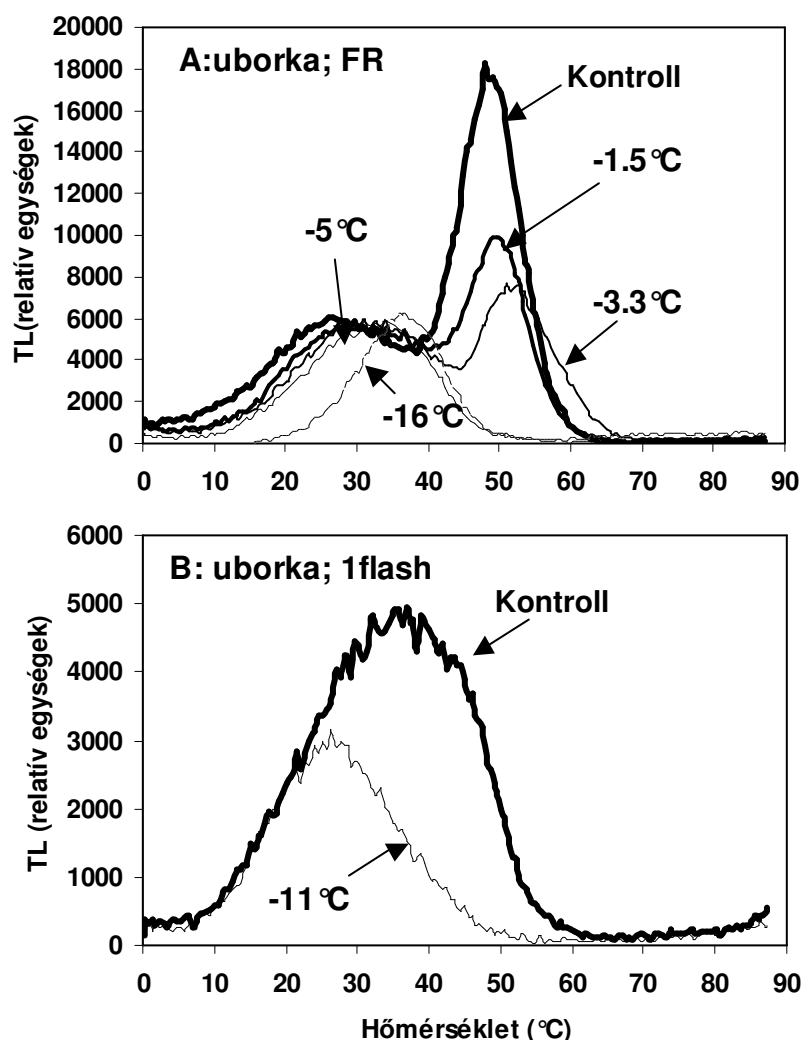


**10. ábra.** Rövid idejű (5 perc) az ábrán jelzett hőmérsékleteken végzett fagyasztás hatása a távoli vörös fénnel (30 s,  $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) indukálható TL görbére  $22/20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on nevelt futómuskátli növényekben több, mint két órás sötétadaptáció után. A kontroll növények ugyanennyi ideig  $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on maradtak. A mérések teljesen kifejlett, de még nem öregedő levelekből származó korongokon történtek, közvetlenül a gerjesztést követően  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$  fűtési sebesség mellett.

#### 4.2.1.4. Uborka és tök

A távoli vörös fénnel indukált TL görbe fagyasztásra történő viselkedése uborkában a kukoricában és a búzában (ill. borsóban) találtak közé esett: a csökkenő hőmérséklettel az AG-sáv fokozatosan csökkent, majd akárcsak a kukoricában, egy küszöbérték alatt teljesen eltűnt. A távoli vörös fény által indukált B-sáv azonban, akárcsak a búzában vagy a borsóban felfelé tolódott (**11A ábra**). Ennek amplitúdója gyakorlatilag nem csökkent szignifikánsan. Mindezzel szemben érdekes módon a *flash*-sel indukált B-sáv nem mutatta ugyanezt a felfelé tolódást (**11B**

*ábra*). A vizsgált tök növények ugyanazt a viselkedést mutatták, mint az uborka (adatok nincsenek bemutatva).

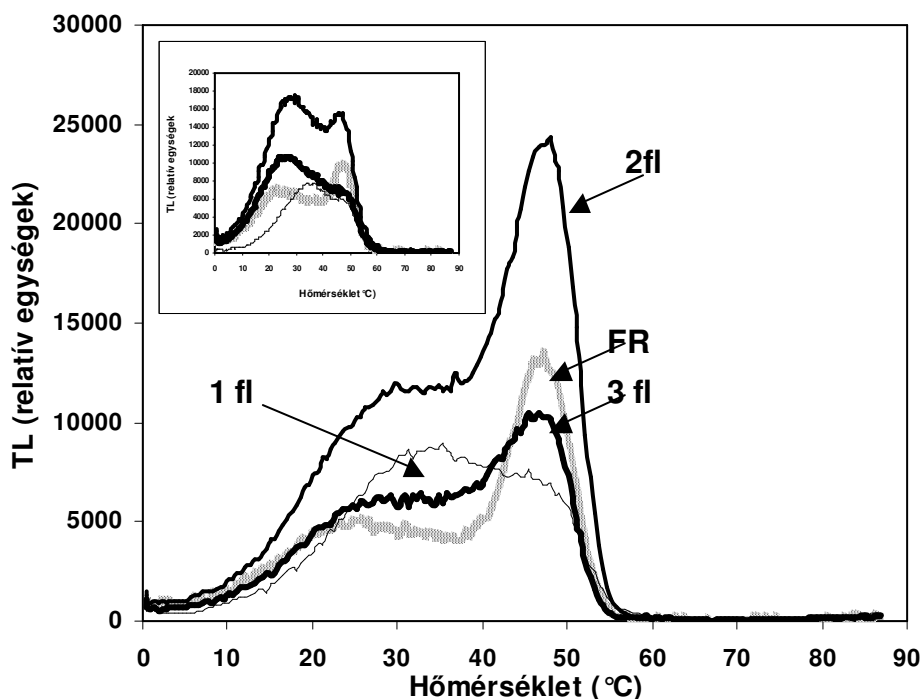


**11. ábra.** Rövid idejű (5 perc), különböző hőmérsékleteken végzett fagyasztás hatása fiatal uborkanövények (A) távoli vörös (FR) és (B) egy elektronátmenetet biztosító fényfelvillanás (1 flash) által indukált termolumineszcencia (TL) görbéjére. A fagyasztás közvetlenül a 0,3 °C-on alkalmazott gerjesztés előtt történt az ábrán jelzett hőmérsékleteken. A kontroll növények ugyanennyi ideig (5 perc) 0,3 °C-on maradtak. A mérések a növények legfiatalabb, teljesen kifejtett levelein, közvetlenül a gerjesztést követően 0,5 °C s<sup>-1</sup> fűtési sebesség mellett történtek.

#### 4.2.1.5. Az AG-sávnak a flash-indukálta TL görbében való részvételének további igazolása

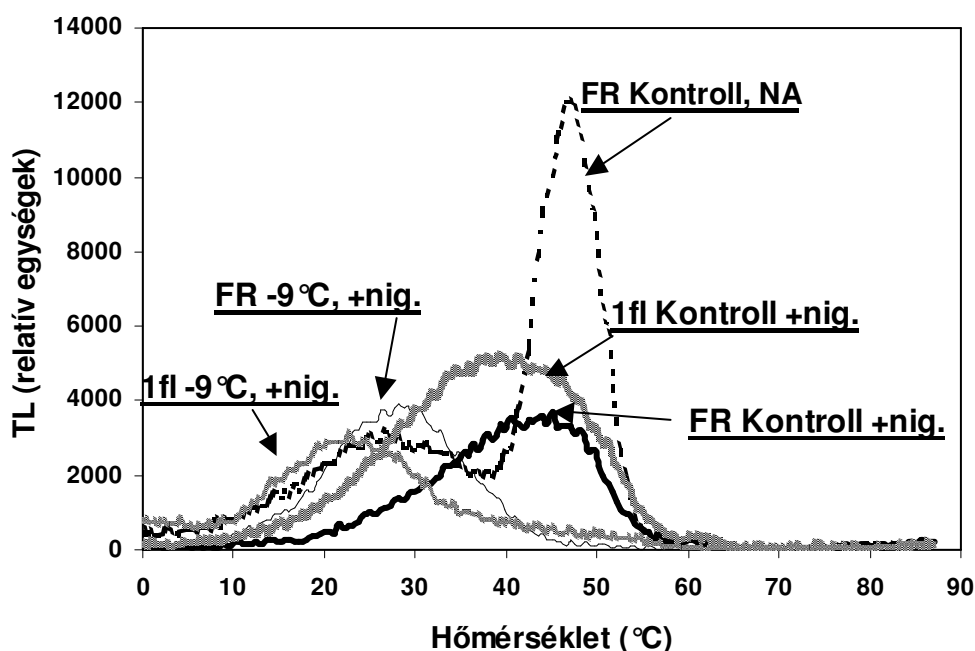
Néhány növényfaj esetében, mint pl. a tök vagy az uborka az AG-sáv jelenléte jól megfigyelhető nemcsak FR, hanem flash-gerjesztés, elsősorban 2 flash hatására is (12. ábra). A

legtöbb faj esetében ez legfeljebb mint egy váll jelentkezik, ezeknél a fajoknál (elsősorban fiatal levelekben) azonban mint önálló sáv volt kimutatható, igazolva ezzel azt a korábbi feltételezésünket, hogy intakt levelekben a *single turnover flash* is képes nemcsak tiszta B-sávot, hanem AG-t indukálni.



**12. ábra.** Az AG-sáv *flash*szám-függése uborka levelekben. Vastag szürke vonal: 30 s távoli vörös (FR) indukálta TL görbe. A vékony, közepes és vastag fekete vonalak fiatal levelekben mért, 1, 2 ill. 3 flash-indukálta TL görbék mutatnak (1, 2, 3fl). Kis ábra: ugyanaz a vizsgálat idős levelekben. A TL mérések közvetlenül a gerjesztést követően  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$  fűtési sebesség mellett zajlottak.

A feltételezésnek, miszerint intakt levelekben a *flash*-indukálta termolumineszcencia görbe AG-sávot tartalmaz, további igazolásához uborka leveleket 0,03 mM nigericinnel (szétkapcsolószer) infiltráltunk. Ahogy az várható volt, a nigericin megszüntette a FR-indukálta AG-sávot. *Flash* gerjesztésre hasonló eredményt kaptunk, bár ekkor a csúcshőmérséklet alacsonyabb volt, mint FR indukció hatására (**13. ábra**).

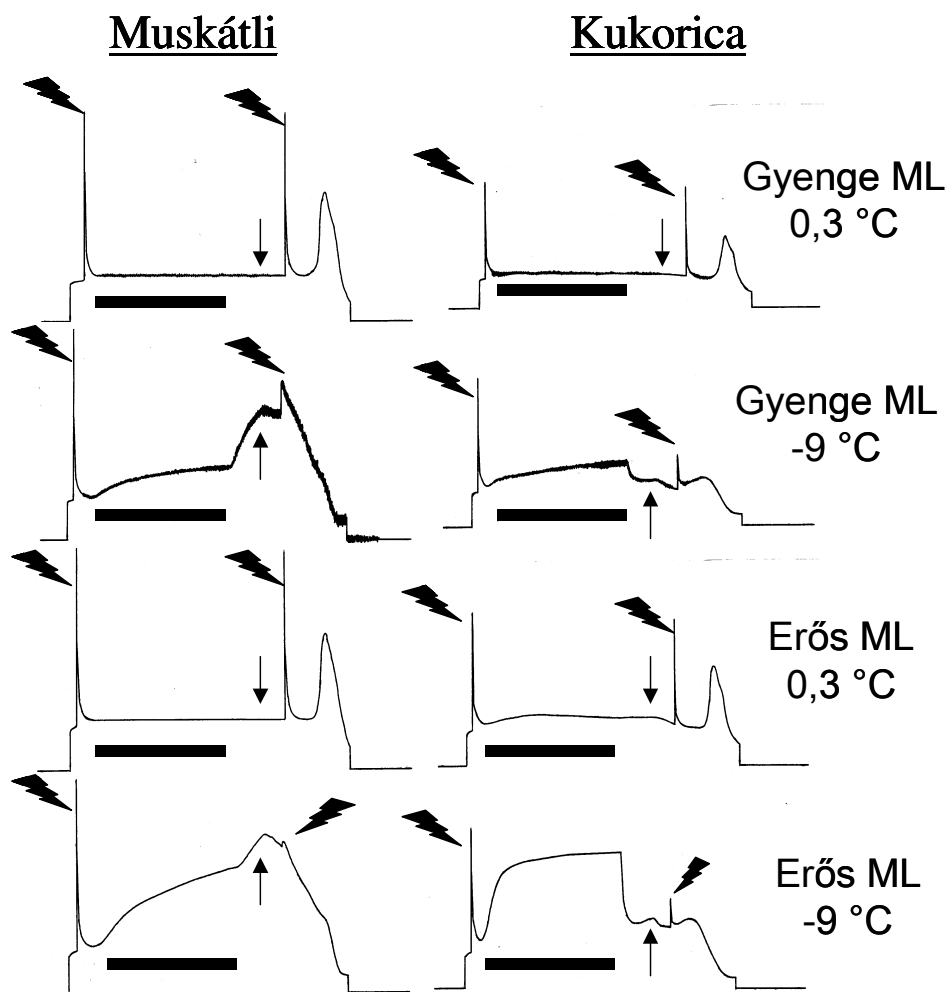


**13. ábra.** Nigericin (nig.) infiltrálás (0,03 mM) hatása egy elektronátmenetet biztosító fényfelvillanás (1fl = *single turnover flash*: szürke vonalak) ill. távoli vörös (FR: fekete vonalak) által indukált TL görbékre fagyasztatlan kontroll (vastag vonalak), ill. előzetesen -9 °C-on fagyasztott (vékony vonalak) uborka növényekben. A szaggatott vonal nigericinmentes (NA) mintában mért FR-indukálta TL görbét mutat. A TL mérések közvetlenül a gerjesztést követően 0.5 °C s<sup>-1</sup> fűtési sebesség mellett zajlottak.

#### 4.2.1.6. Fagyasztás hatásának vizsgálata klorofill-a fluoreszcencia indukcióval

Hogy a fagyasztás alatt történeteknek termolumineszcenciában való megnyilvánulását jobban megértsük, a folyamatot fluoreszcencia indukcióval is nyomon követtük kukoricában és futómuskátliban. Ehhez a kontroll növényeket 0,3, a fagyasztottakat -9 °C-on tartottuk 5 percen át. Mindezt egy 1 perces 0,3 °C-os inkubáció követte (a TL méréshez itt történt a gerjesztés), majd a hőmérsékletet 0,5 °C/s sebességgel emeltük +90 °C-ig. A mérést két mérőfény intenzitáson végeztük. A PS2 maximális kvantumhatásfokának meghatározása telítési fénypulzussal történt mind a fagyasztás előtt, mind az követően, amikor a hőmérsékleti gradiens elérte a 20 °C-ot. (**14. ábra**). A fagyasztás előtti  $F_v/F_m$  értékek muskátliban  $0,804 \pm 0,006$ , kukoricában  $0,768 \pm 0,008$  értékeknek adódtak. A kezdeti fluoreszcencia ( $F_0$ ) mindkét faj esetében jelentősen emelkedett az alacsony hőmérsékleti periódus alatt. Más szerzők (Pospíšil és

mtsai., 1998) korábban hasonló emelkedést tapasztaltak árpában is, amit hasonlóan a magas hőmérsékleten (60 °C körül) általánosan megfigyelhető  $F_0$  emelkedéshez (Schreiber és Berry, 1977) szintén a PS2 antennarendszerének leválásával és átrendeződésével magyaráztak. Ennek némileg ellentmond, hogy szemben a magas hőmérsékleten megfigyelhető  $F_0$  növekedéssel, a fagyasztás során létrejött emelkedés mértéke erős mérőfényintenzitás-függést mutat: magasabb mérőfény mellett az emelkedés is nagyobb mértékű (14. ábra).



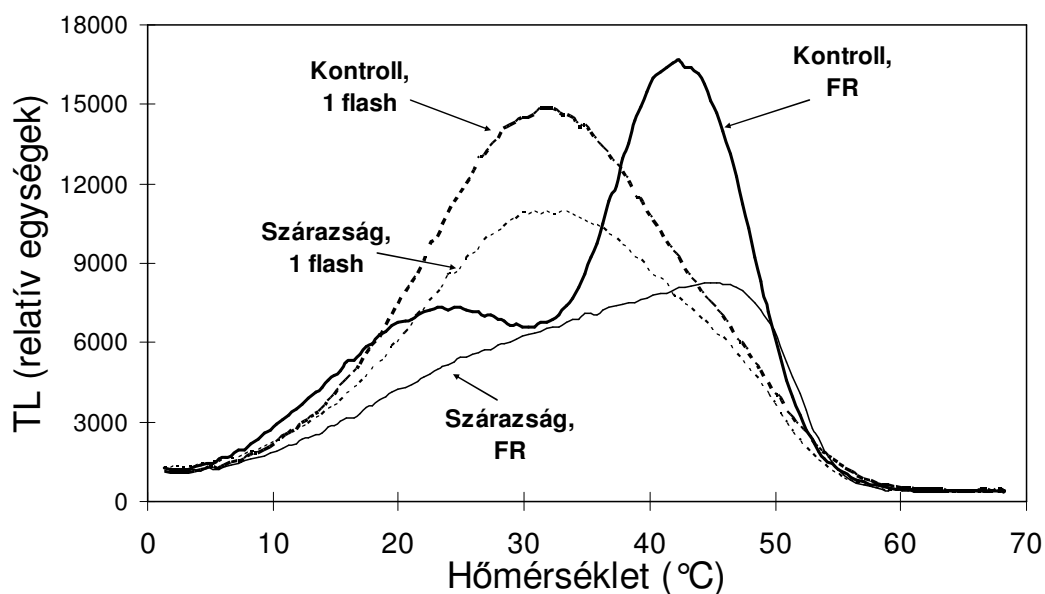
**14. ábra.** Klorofill-a fluoreszcencia indukciós görbék ugyanolyan körülmények közt felvéve, ahogy a TL-mérések történtek. A kezdeti fluoreszcencia ( $F_0$ ) mérése kétféle, gyenge (PAM 101: 5-ös pozíció), valamint erős (PAM 101: 10-es pozíció) mérőfény-intenzitás (ML) mellett történt. A mérés elején a levélszegmensek 1 percen át 20 °C-on voltak, amikor meghatároztuk a maximális fluoreszcencia ( $F_m$ ) értékét (1. villámjel). Ezt követően a levéldarabokat vagy 0,3 °C inkubáltuk (kontroll), vagy -9 °C-on fagyasztottuk (vastag vízszintes vonal). Mindezt egy perces inkubáció követte 0,3 °C-on, majd 0,5 °C/s sebességgel felfűtöttük 87 °C-ig (a fűtés kezdetét nyilak jelzik). A fagyasztás hatására bekövetkező maximális fluoreszcencia változását újabb telítési felvillanásokkal határoztuk meg (2. villámjel) azután, hogy a minta hőmérséklete a fűtés során elérte a 20 °C-ot.



Az ábra *recovery* szakasza (a fagyasztást jelző vastag vízszintes vonal utáni szakasz 0,3 °C-on) jól szemlélteti a két vizsgált faj közti különbséget is: míg kukoricában fagyasztás után az  $F_0$  viszonylag gyorsan visszaáll a kiindulási szintre, addig a muskátliban még gyorsabban tovább emelkedik. Mire a hőmérséklet a 0,5 °C/s sebesség mellett eléri a 20 °C-ot, addigra különösen magas mérőfény alkalmazása mellett az  $F_v$  (ill.  $F_m$ ) érték mindkét faj esetében kisebb, mint a kiindulási, fagyasztás előtti  $F_v$  (ill.  $F_m$ ) érték. Megfigyelhető az is, hogy a magas hőmérsékleti  $F_0$  emelkedés csúcshőmérséklete kukoricában fagyasztás hatására, szintén a mérőfény intenzitásának függvényében, alacsonyabb hőmérsékletre tolódott. Fagyasztás nélküli mintákban ilyen mérőfényfüggést nem lehetett megfigyelni (adatok nincsenek bemutatva). Muskátliban ugyanez a jelenség a kezdeti fluoreszcencia már eleve rendkívül magas volta miatt nem detektálható.

#### 4.2.2. Szárazság és hőstressz

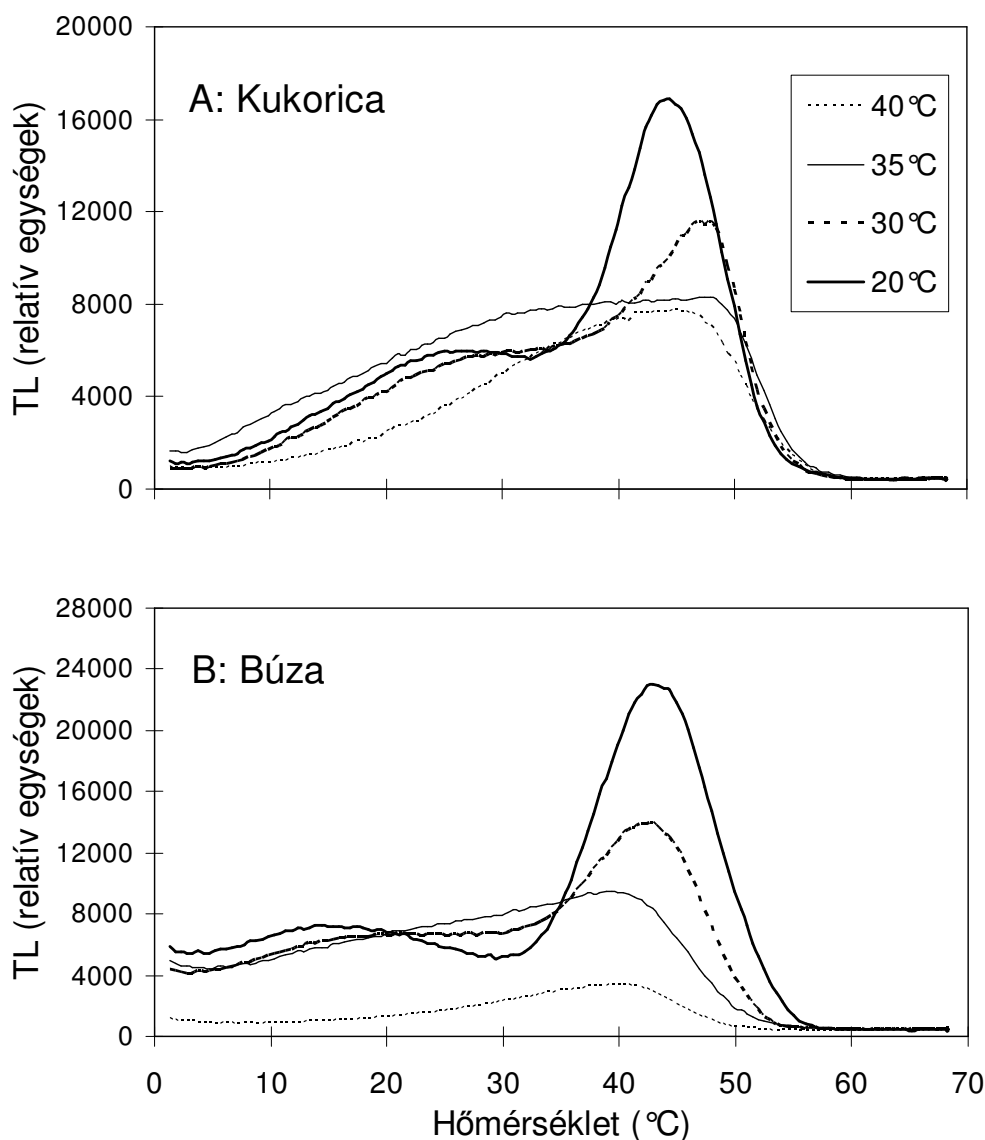
Szárazság (**15. ábra**) és rövid idejű (5 perc) hőstressz (**16. ábra**) hatására, az alacsony hőmérsékleti stresszhez hasonlóan az AG-sáv érzékenyebben reagált, mint a B-sáv.



**15. ábra.** 1 napos vízmegvonással előidézett szárazság hatása 30 s távoli vörös fénnel (FR), ill egy elektronátmenetet biztosító fényfelvillanás (1 *flash*) indukálta termolumineszcencia (TL) görbékre fiatal, sötétadaptált, tápoldatban nevelt kukoricánövényekben. A TL indukciója 0 °C-on történt a növények legfiatalabb, teljesen kifejlett levelein.

Azonban a fagyasztással ellentétben, ahol egy kritikus hőmérséklet alatt hirtelen következett be a csökkenés, a hőmérsékletnek az optimális fölé való emelésével egy fokozatos, hőmérsékletfüggő AG csökkenést kapunk, melynek hatására kb. 35 °C fölött az AG-sáv az amúgy melegkedvelő kukoricában is (**16A ábra**), de az inkább hidegtűrő búzában különösen, jelentős mértékben lecsökken (**16B ábra**).

Mind a magas hőmérsékleti előkezelés, mind a szárazság az AG-sáv csúcshőmérsékletének magasabb hőmérséklet felé tolódását eredményezi kukoricában. Búzában ilyen változást nem figyeltünk meg.



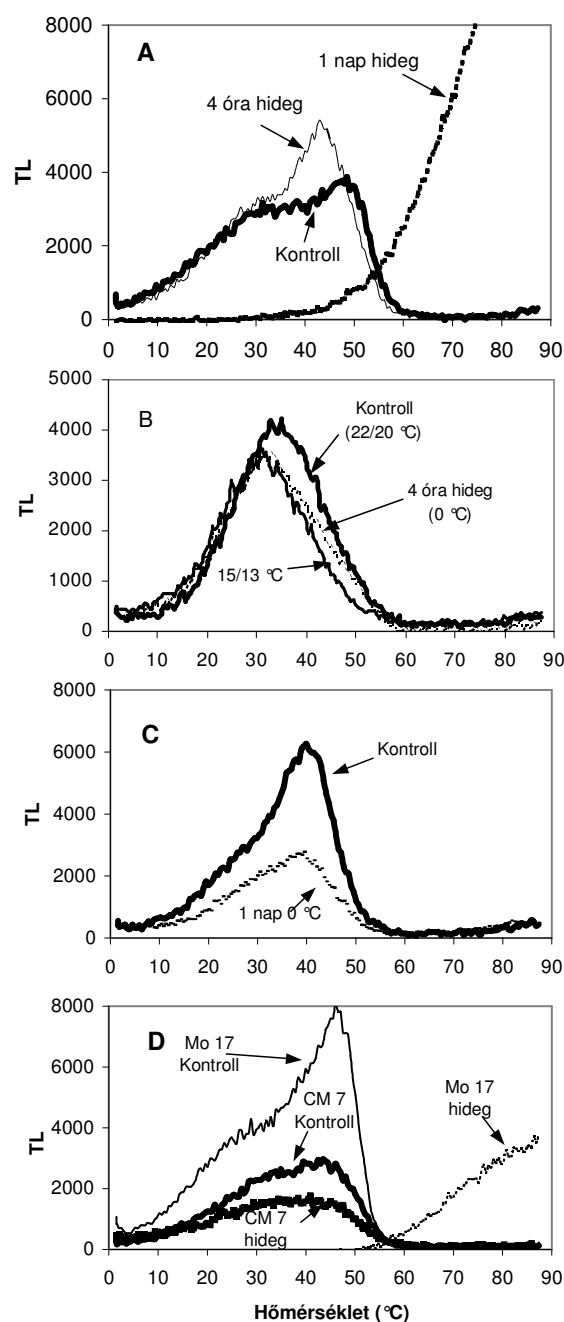
**16. ábra.** Rövid idejű (5 perc) hőkezelés hatása a távoli vörös fénnel indukált termolumineszcencia (TL) görbére. A: kukoricában (Norma hibrid), B: búzában (Chinese Spring). A TL indukciója 0 °C-on történt a növények legfiatalabb, teljesen kifejtett levelein.

#### 4.2.3. Alacsony hőmérsékleti stressz (*chilling*) detektálása kukoricában termolumineszcenciával

A következő kísérletsorozatban az alacsony hőmérsékleti, de fagypont feletti stressz (*chilling*) hatását vizsgáltuk egy hidegérzékeny gabonaféle, a kukorica egyes TL komponenseire. A vizsgálatokhoz fiatal, 22/20 °C-on nőtt növényeket használtunk. Az előzetesen rövid ideig (4h) alacsony hőmérsékleten (0 °C) tartott kukoricánövényekben az FR indukálta AG-sáv meglepő módon emelkedést mutatott, mialatt a csúcshőmérséklete az alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódott (**17A ábra**). A 1 *flash*-sel indukált B-sáv emelkedést nem mutatott, de kismértékű sáveltolódás megfigyelhető volt (**17B ábra**). Tartós stresszhatás következtében mind a B, mind az AG-sáv eltűnik, ill. megjelenik a lipidperoxidációra utaló magas hőmérsékleti sáv. Ez különösen azon levélrészekben volt jelentős, ahol már a hidegstresszre jellemző vízvesztés is bekövetkezett. Nedves mintákban a sáv általában kisebb (Ducruet és Vavilin, 1999).

A következőkben az alacsony hőmérsékleti edzés hatását vizsgáltuk kukoricában. Ismert, hogy kukoricánövények szuboptimális hőmérsékleten való nevelése képessé teszi őket egy drasztikusabb mértékű hideghatás, ill. az ezzel együtt járó fotoinhibíció elviselésére (Janda és mtsai., 1998). Jelen kísérletben az akklimatizációs hőmérséklet 15/13 °C volt. Ezekben a növényekben az AG-sáv alacsonyabb hőmérsékleten volt, és az 1 napos 0 °C-os *chilling* hatására lényegesen kisebb mértékben csökkent le, mint a kontroll, nem akklimatizált növényekben (**17C ábra**). Az alacsony hőmérsékleti akklimatizáció nemcsak az AG, hanem a B-sáv csúcshőmérsékletében eltolódást eredményezett (**17B ábra**). Az AG-sáv csúcshőmérsékletének hidegedzés hatására bekövetkező csökkenése összhangban van azokkal az eredményeinkkel, miszerint a hidegtűrő vonalak csúcshőmérséklete megvilágítás hatására gyorsabban és alacsonyabb hőmérsékletre csökken, mint az érzékeny vonalakban (Ducruet és mtsai., 2005b; adatok nincsenek bemutatva).

Annak demonstrálására, hogy a FR fénnel indukálható TL alacsony hőmérsékleti stresszt követő változása hogyan tükrözi az adott genotípus hidegtűrését, két beltenyésztett kukoricavonalat, a hidegtűrő CM 7-et, és a hidegérzékeny Mo 17-et hidegkezeltünk. Az előzetesen várt hidegtűrési tulajdonságokat ionkiáramlás méréssel erősítettük meg: 2 napos 0 °C-os hidegstressz hatására a membránok jelentős károsodása jól nyomon követhető az elektrolitok kiáramlásával is. Mindez a hidegtűrő vonalban jóval kisebb mértékű volt, mint az Mo 17-ben (**4. táblázat**).

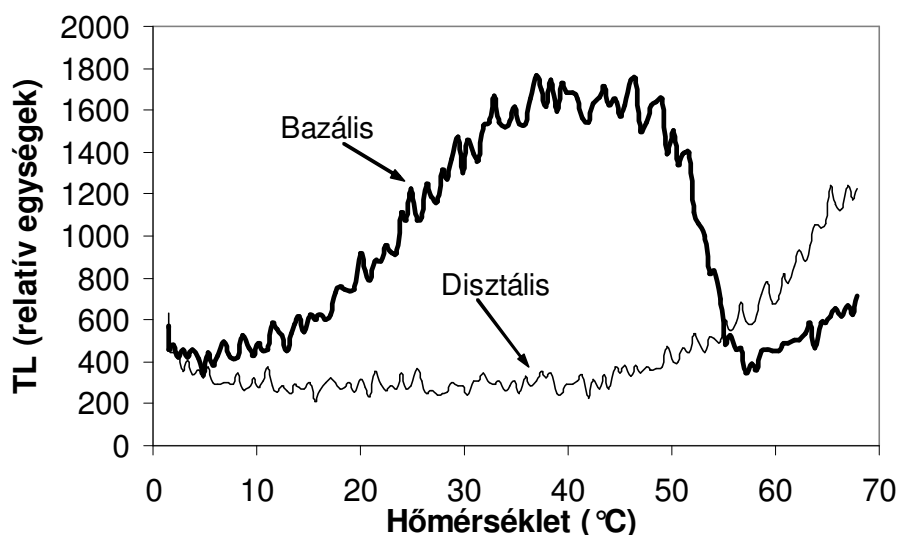


**17. ábra. A:** 30 s távoli vörös fény által indukált termolumineszcencia (TL) görbe (relatív egységekben megadva) változása 4 óra vagy 1 nap alacsony hőmérsékleti stressz (0 °C) hatására fiatal, 22/20 °C-on nőtt kukoricanövényekben (Norma hibrid). **B:** 4 órás hidegkezelés (0 °C) vagy alacsony növekedési hőmérséklet (15/13 °C) hatása 1 flash által indukált TL görbére fiatal kukoricanövényekben (Norma hibrid). **C:** 30 s távoli vörös fény által indukált TL görbe változása 1 nap alacsony hőmérsékleti stressz (0 °C) hatására fiatal, 15/13 °C-os edzési hőmérsékleten nőtt kukoricanövényekben (Norma hibrid). **D:** A: 30 s távoli vörös fény által indukált TL görbe változása 1 nap alacsony hőmérsékleti stressz (0 °C) hatására fiatal, 22/20 °C-on nőtt Mo 17 hidegérzékeny és CM 7 hidegtűrő kukoricanövényekben. A minták a legfiatalabb teljesen kifejlett levelek középső harmadából származtak.

**4. táblázat.** Elektrolit-kiáramlás értékek a teljesen sérült (1 nap -80°C) levélkorongokban mért értékek százalékában kifejezve kontroll (22/20 °C) és hidegkezelt (2 nap 0°C) hidegtűrő (CM 7) és hidegérzékeny (Mo 17) kukoricavonalakban. A mérések a legfiatalabb, de teljesen kifejezett leveleken történtek. \*\*, \*\*\*: 0,01 ill. 0,001 szinten szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva (n = 10).

Genotípus	Kontroll	Hidegkezelt
CM 7	22,3 ±4,6	31,6 ± 7,7**
Mo 17	23,1 ±5,9	65,8 ±16,1***

A távoli vörös fény által indukált TL görbe hasonló változást hozott: 1 nap 0 °C-os hidegstressz után az AG-sáv a hidegérzékeny Mo17 vonalban teljesen eltűnt, és megjelent a magas hőmérsékletű HTL-sáv (**17D ábra**). A hidegtűrő CM 7-ben az AG-sáv lecsökkent ugyan, de még kimutatható volt, míg a HTL-sáv még nem jelent meg. Meg kell jegyezni továbbá, hogy az egyes genotípusok összehasonlításánál arra is tekintettel kell lenni, hogy ugyanazon növény adott levelében a károsodás mértéke eltér, ami a kísérletek rendkívül körütekintő sztenderdizálását követeli meg. A **18. ábrán** bemutatjuk, hogy adott kukoricalevél bazális (a szárhoz közelebb eső rész) régiójában a hidegstressz hatása lényegesen később jelentkezik, mint ugyanannak a levélnek a disztális (levélcsúcsi) régiójában.

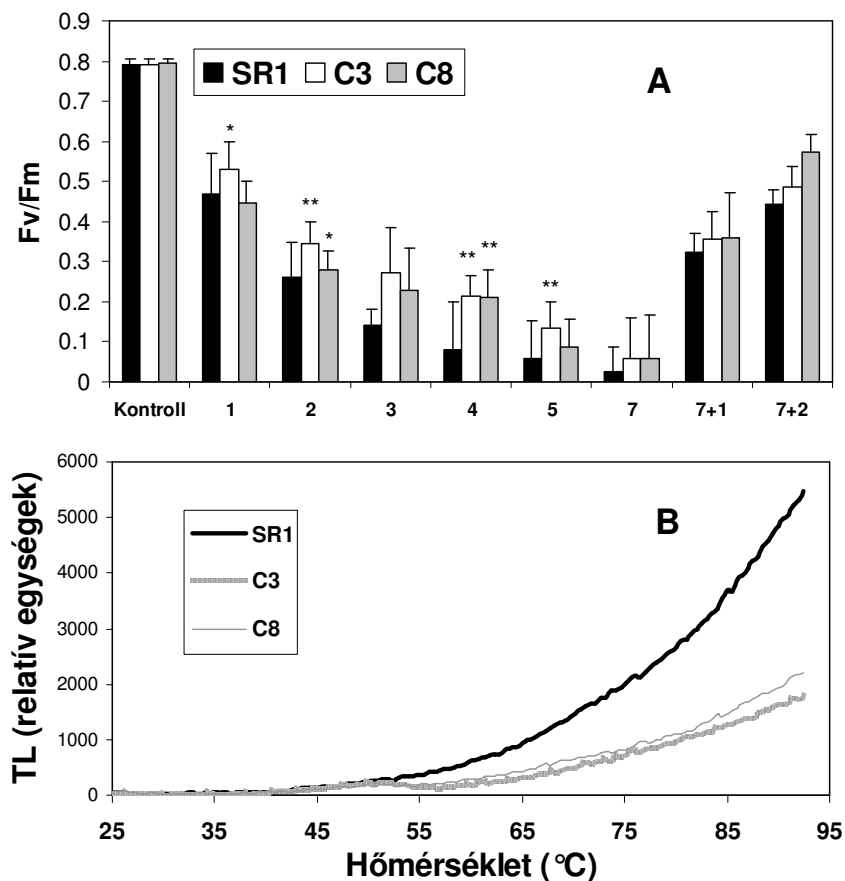


**18. ábra.** 30 s távoli vörös fénnel indukált termolumineszcencia (TL) görbék 1 nap 0 °C-os hidegkezelésnek kitett Norma hibrid kukoricánövények legfiatalabb teljesen kifejlett leveleinek bazális (vastag vonal) ill. disztális (vékony vonal) régiójából.

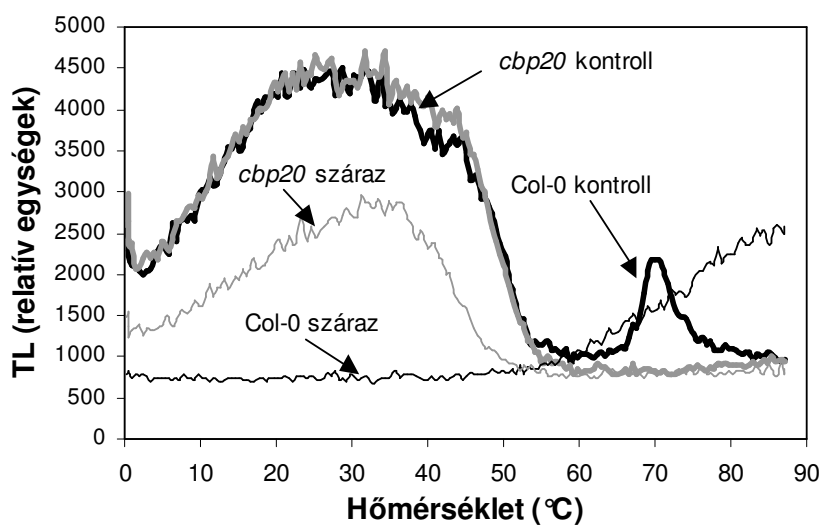
#### 4.2.4. Mutáns és transzgenikus növények abiotikus stressztűrő képességének vizsgálata termolumineszcenciával

A termolumineszcencia további gyakorlati alkalmazási lehetőségének bemutatásához álljon itt néhány olyan példa, melyek transzgenikus ill. mutáns növények abiotikus stresszel szembeni tűrőképességét demonstrálják. A HTL mint hidegtűrést jellemző paraméter demonstrálására első kiegészítő vizsgálatként ferritin gént kloroplasztidiálisan túltermelő transzgenikus dohány genotípusokat teszteltünk. Korábbi vizsgálatainkban ugyanezen gén alacsony hőmérséklet által indukált fotoinhibíció elleni védő hatását citoplazmatikusan túltermelő vonal esetében már bemutattuk (Hegedűs és mtsai., 2002). Az itt leírt eredmények ennek a kísérletsorozatnak a kiegészítése a ferritin gént kloroplasztidiálisan túltermelő vonalak felhasználásával. A növények hidegkezelése 7 napon át állandó megvilágítás mellett 0,5 °C-on történt. A **19A ábra** mutatja az  $F_v/F_m$  változását a hidegkezelés alatt, ill. az azt követő két nap helyreállítás során, amikor a növények ismét normál hőmérsékletre (22/20 °C) kerültek. Az adatokból látszik, hogy mindkét vizsgált ferritintúltermelő transzgenikus dohányvonalban (C3 és C8 jelűek) az  $F_v/F_m$  paraméter a vizsgált időpontok nagy részében kevésbé csökkent le az alacsony hőmérséklet hatására, mint a SR1 vad típusú növények esetében. A hidegstressz látható tünete volt a levelek fonnyadása. Az alacsony hőmérsékleti periódus alatt az első 7 napban a növények közt szemmel látható különbség nem volt. Hét nap hidegstressz után normál hőmérsékleten a levelek visszanyerték turgorukat, és az  $F_v/F_m$  paraméter is visszaállást jelzett (**19A ábra**). Emellett azonban mint *post-chilling* tünetek, klorotikus foltok is megjelentek, elsősorban az SR1 levelein. Bár az  $F_v/F_m$  paraméter a helyreállítás miatt ebben a stádiumban nem mutatott statisztikusan szignifikáns különbséget a vad típusú és transzgenikus vonalak között, a **19B ábra** mutatja, hogy 2 nap helyreállási fázist követően az előzetesen jobb hidegtűrést mutató C3 és C8 jelű vonalakban a lipidperoxidok mennyiségével korreláló HTL-sáv megjelenése hidegstresszt követően kisebb mértékű volt, mint a vad típusú egyedekben.

A fentivel analóg kísérletben *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növények szárazságtűrését teszteltük. Ez a genotípus egy *Cap Binding Protein 20*-ban lévő inszerciós mutációt hordoz, és előzetes vizsgálatok szerint néhány fenotípusos eltérés mellett abszcizinsav túlérzékenységet mutat (Papp és mtsai., 2004). Ennek következtében vízhiányos körülmények közt gázcserenyílásait gyorsan zárja.



**19. ábra.** **A:**  $F_v/F_m$  paraméter változása 7 nap (1-7) hidegstressz (0,5 °C) és 2 nap helyreállítás (7+1, 7+2) során vad típusú (SR1) és ferritin gént kloroplasztiálisan túltermelő transzgenikus dohánynövényekben (C3 és C8). \*, \*\*: szignifikáns különbség az SR1 értéktől 0,05 ill. 0,01 szinten. **B:** Távoli vörös fényel gerjesztett termolumineszcencia (TL) görbék SR1, ill. C3 és C8 genotípusokban.



**20. ábra.** Távoli vörös fényel gerjesztett termolumineszcencia (TL) görbék vad típusú (Col-0; fekete vonalak) és *cbp20* mutáns (szürke vonalak) *Arabidopsis* növényekben 9 napos szárazságstressz előtt (vastag vonalak) és után (vékony vonalak).

Kimutatható volt, hogy a drasztikus szárazságnak kitett növényekben 9 nap vízelvonás mellett (22/20 °C) a vad típusú növényekben (Columbia; Col-0) a távoli vörös fénnel indukált TL görbén már csak a HTL-sáv volt detektálható, addig a mutáns növényekben jól mérhető B- és AG-sáv egyaránt megvolt (**20. ábra**). Mindemellett, a kontroll vad típusú genotípusban kimutatható volt egy 70 °C körüli csúcshőmérséklettel jellemezhető sáv, mely a mutánsban alig detektálható, és erős szárazságstressz után is eltűnt, de helyét átvette a 100 °C feletti HTL-sáv.

### ***4.3. Az antioxidáns enzimrendszer szerepe a gabonafélék alacsony hőmérsékleti adaptációjában***

#### ***4.3.1. Gabonafélék fagyállósága és antioxidáns aktivitása közti kapcsolat vizsgálata***

A következő kísérletsorozat célja annak eldöntése volt, hogy milyen korreláció áll fenn az egyes gabonafélék fagyállósága és antioxidáns aktivitásának mértéke között. Ezekhez a vizsgálatokhoz a következő genotípusokat használtuk fel: Cheyenne, Mv Magvas, Bánkúti 1201 őszi búzák; Chinese Spring tavaszi búza; Chinese Spring/Cheyenne5A, Chinese Spring/Cheyenne5D kromoszóma-szubsztitúciós vonalak; Presto tritikále; Motto rozs; Hardy őszi árpa; Gerald őszi zab és Martondur 1 durumbúza. A kontroll, edzetlen növények 3 hétig 17/16 °C-on nőttek, a hidegedzett növények egy 7 hétig tartó, 14/7 °C-ról 3/-3 °C-ig csökkenő hidegedzésen estek át (Veisz és mtsai., 1997 alapján). A fagyállóság megállapítása -11, -13 ill. -15 °C-on történő fagyasztást követő újranivelés utáni bonitálással, az egyes antioxidáns enzimek (kataláz, POD, APX, GST, GR) aktivitásának meghatározása fotometriásan történt. A fagyasztási teszt eredményeként a vizsgált genotípusokat 2 fő csoportba különítettük el: a Chinese Spring, a Gerald, a Chinese Spring/Cheyenne5D, Chinese Spring/Cheyenne5A és a Hardy gyenge, az Mv Magvas, a Presto, a Cheyenne, a Martondur 1, a Bánkúti 1201 és a Motto jó fagyállónak bizonyultak (**5. táblázat**).

Hogy a csoportokon belül is differenciálni lehessen, a gyenge fagyállóságúak -11 °C-on, a jó fagyállóságúak -15 °C-on is fagyasztva lettek. Ezek alapján a Chinese Spring/Cheyenne 5D és a Chinese Spring/Cheyenne 5A vonalak a várakozásnak megfelelően jobbnak bizonyultak mind a Chinese Spring, mind a Gerald fajtaénál, a Hardy árpa viszont jobb volt a csoport összes tagjánál. A fagyűrő csoportban a Motto rozsfajta szignifikánsan jobb volt az Mv Magvas és B1201 fajtaénál is. A Martondur 1 jobb volt, mint az Mv Magvas.



Azok a növények, melyek nem voltak alacsony hőmérsékleten edzve, még -11 °C-os fagyasztás mellett is mind kipusztultak.

**5. táblázat.** Gabonafélék fagyállósága különböző fagyasztási hőmérsékletek (-11, -13, -15 °C) mellett. LSD 5% a legkisebb szignifikáns különbséget mutatja  $p \leq 5\%$  szinten. CS: Chinese Spring, Ch: Cheyenne.

Genotípusok	Túlélés (%)		
	-11 °C	-13 °C	-15 °C
<b>Szenzitív csoport:</b>			
<b>Chinese Spring</b>	0	0	
<b>Gerald</b>	1,3	0	
<b>CS/Ch 5D</b>	28,0	5	
<b>CS/Ch 5A</b>	32,9	16,1	
<b>Hardy</b>	77,3	26,7	15,6
<b>Toleráns csoport:</b>			
<b>Mv Magvas</b>		86	72,2
<b>Presto</b>		87,3	81,1
<b>Cheyenne</b>	91,3	88,9	
<b>Bánkúti 1201</b>		94,3	77,8
<b>Martondur 1</b>		89,7	88,9
<b>Motto</b>		100	90,8
<i>LSD 5%</i>	<i>9,9</i>	<i>12,7</i>	<i>11,4</i>

Az antioxidáns aktivitást tekintve általánosságban elmondható, hogy a legfagyállóbb genotípus, a Motto rozs fajta gyakorlatilag minden vizsgált enzim vonatkozásában a legnagyobb aktivitást mutatta. Ennek ellenére az egyes antioxidáns enzimek közül csak a levélből kivont APX és POD enzimek aktivitása mutatott szoros korrelációt a fagyállósággal, és ezek is csak az edzett genotípusok esetében (**6. táblázat**).

Az egyes enzimek aktivitásait a bokrosodási csomóban vizsgálva (**21. ábra**) megállapíthatjuk, hogy a legnagyobb kataláz aktivitás a Motto rozsban volt, de szintén magas volt az Mv Magvas és B1201 őszi búza, és a Gerald őszi zabfajtákban. Ezzel szemben az APX aktivitás jelentősen alacsonyabb volt a Geraldban, mint a többi genotípusban, és szintén alacsony volt a Hardy árpában.

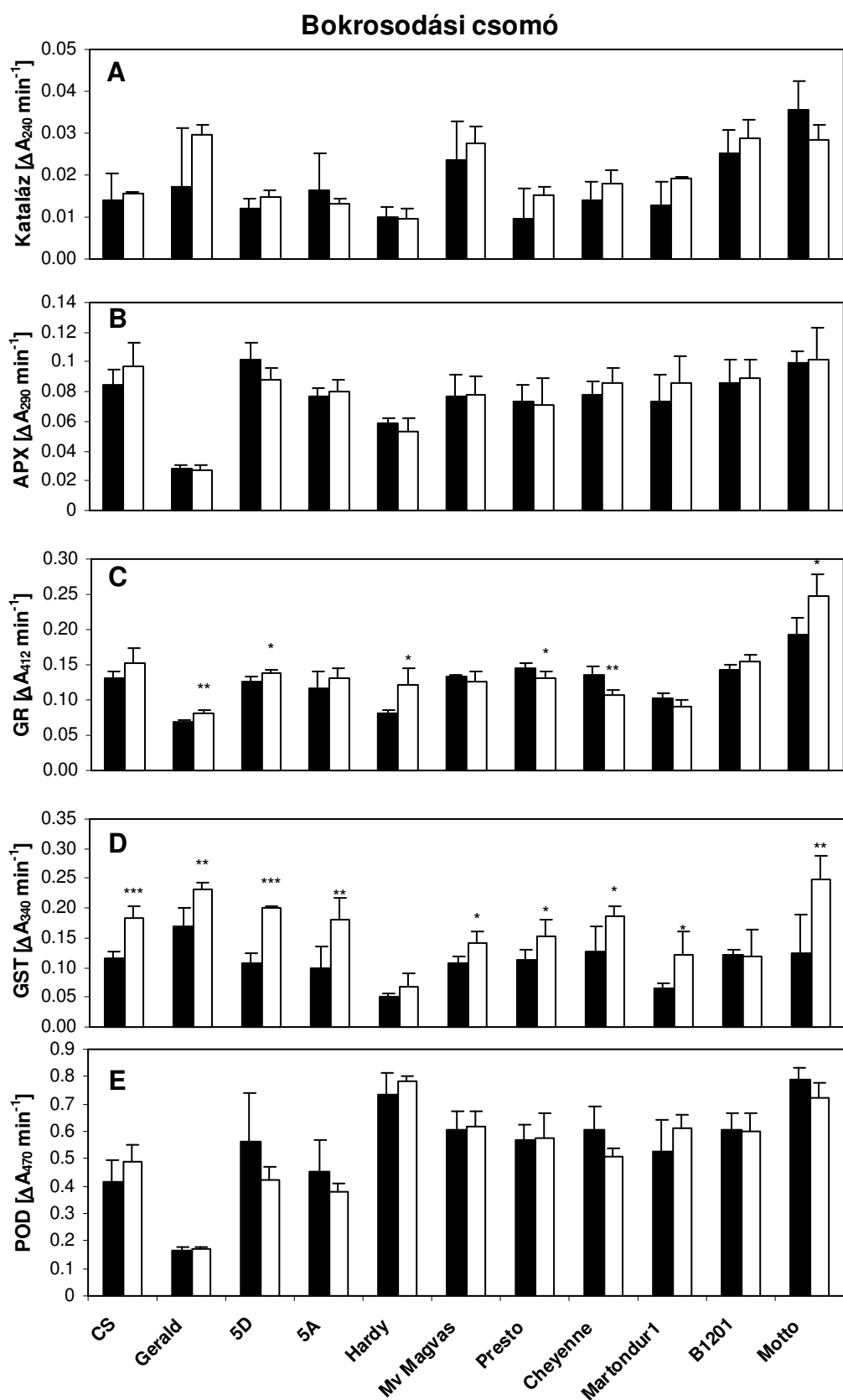
**6. táblázat.** Korreláció a vizsgált gabonafélék fagyállósága és az egyes enzimek aktivitása között (\*\*: szignifikáns korreláció  $p \leq 0,01$  szinten).

Enzim	Korrelációs koefficiens			
	Bokrosodási csomó		Levél	
	Edzetlen	Edzett	Edzetlen	Edzett
<b>Kataláz</b>	0,442	0,389	0,249	0,631
<b>Aszcorbát-peroxidáz</b>	0,305	0,396	0,341	0,791**
<b>Gvajakol-peroxidáz</b>	0,594	0,596	0,431	0,820**
<b>Glutation-S-transzferáz</b>	-0,098	-0,178	-0,329	-0,520
<b>Glutation-reduktáz</b>	0,587	0,280	-0,481	0,314

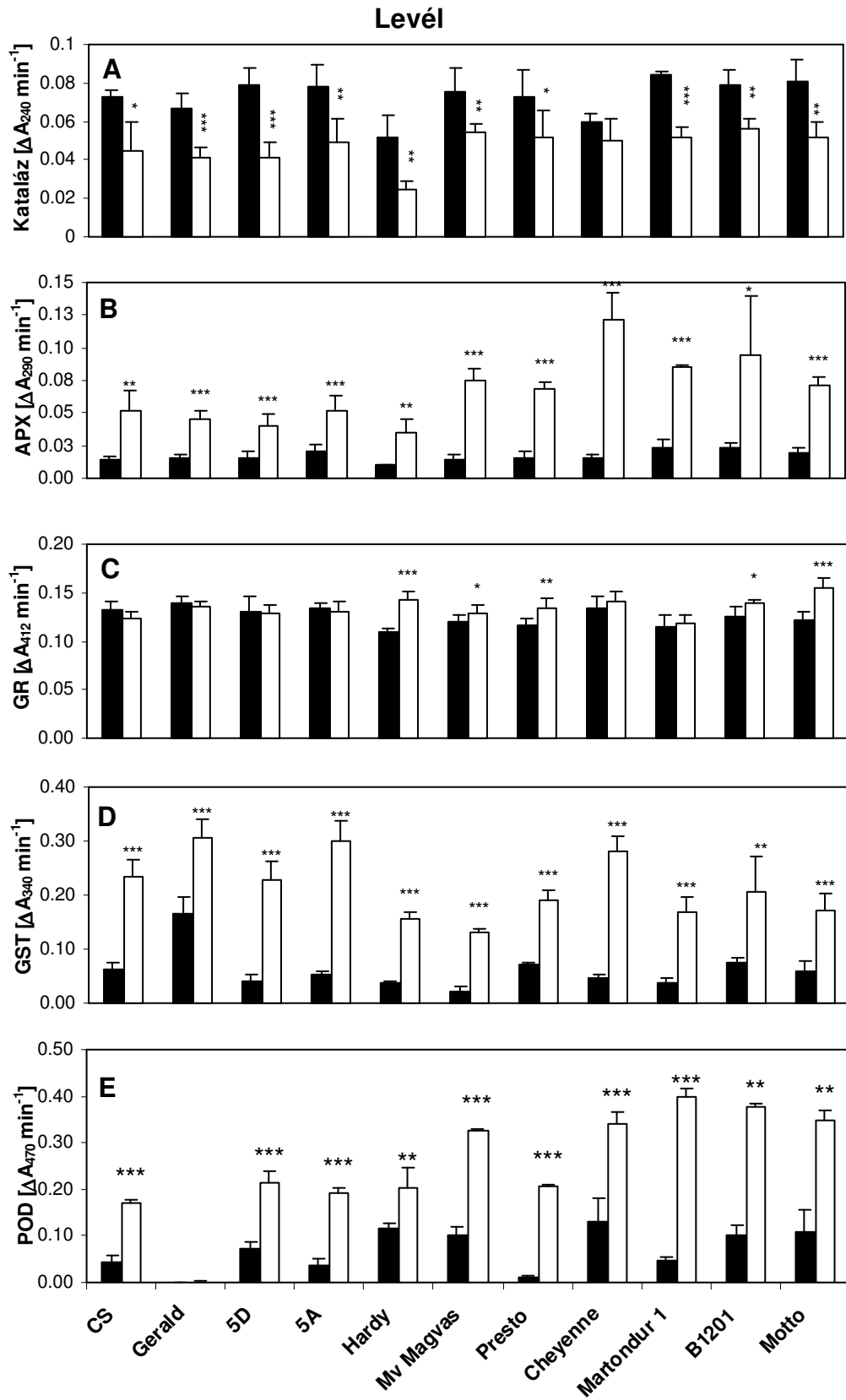
A Gerald zabfajta POD aktivitása szintén alacsony volt, viszont a Hardy árpában, szemben az APX aktivitással a legmagasabb POD érték volt mérhető. A GR aktivitás a Gerald fajtában volt a legkisebb, és a Mottóban a legnagyobb. A többi fajtánál nem volt jelentős különbség. A GST aktivitás a Hardy árpában volt a legkisebb, és az edzett Motto rozsfajtában a legnagyobb.

Levelek esetében (22. *ábra*) a kataláz aktivitás meglehetősen alacsony volt a Hardy árpafajtában a többi genotípushoz képest. A többi fajtában nem volt jelentős eltérés. Mind az APX, mind a POD enzimek esetében az edzett növényekben jó korrelációt mutatott ezen enzimek aktivitása és az adott genotípus fagyállósága. Meg kell jegyezni, hogy a Gerald zabfajtában a POD enzim aktivitása mind a kontroll, mind az edzett növények esetében extrém mértékben alacsony volt. A GST aktivitás szintén magasabb volt az edzett növényekben, azonban hasonlóan a GR enzimhez, a vizsgált genotípus-szortimentben nem volt korreláció a fagyállósággal.

Az edzett és edzetlen növényeket összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a vizsgált enzimek közül edzés hatására jelentős növekedést a bokrosodási csomó esetében a GST, a levélben a GST, a POD és APX mutatott. A levél kataláz aktivitása a legtöbb esetben az edzett növényekben kisebb volt, mint az edzetleneké. A GR csupán néhány genotípus (Hardy, Mv Magvas, Presto, B1201 és Motto) esetében mutatott nagyobb értéket az edzett növényekben, mint a kontrollokban. A POD, GST és APX enzimek viszont rendre aktívabbak voltak az edzett csoportban, mint a kontroll növényekben.



**21. ábra.** Egyes antioxidáns enzimek aktivitása edzetlen (15/13 °C; fekete oszlopok) és edzett (fehér oszlopok) gabonafélék bokrosodási csomóiban (n = 5; \*, \*\*, \*\*\*: szignifikáns különbség az edzés hatására p ≤ 0,05, 0,01, ill. 0,001 szinten).



**22. ábra.** Egyes antioxidáns enzimek aktivitása edzetlen (15/13 °C; fekete oszlopok) és edzett (fehér oszlopok) gabonafélék leveleiben (n = 5; \*, \*\*, \*\*\*: szignifikáns különbség az edzés hatására  $p \leq 0,05$ , 0,01, ill. 0,001 szinten).

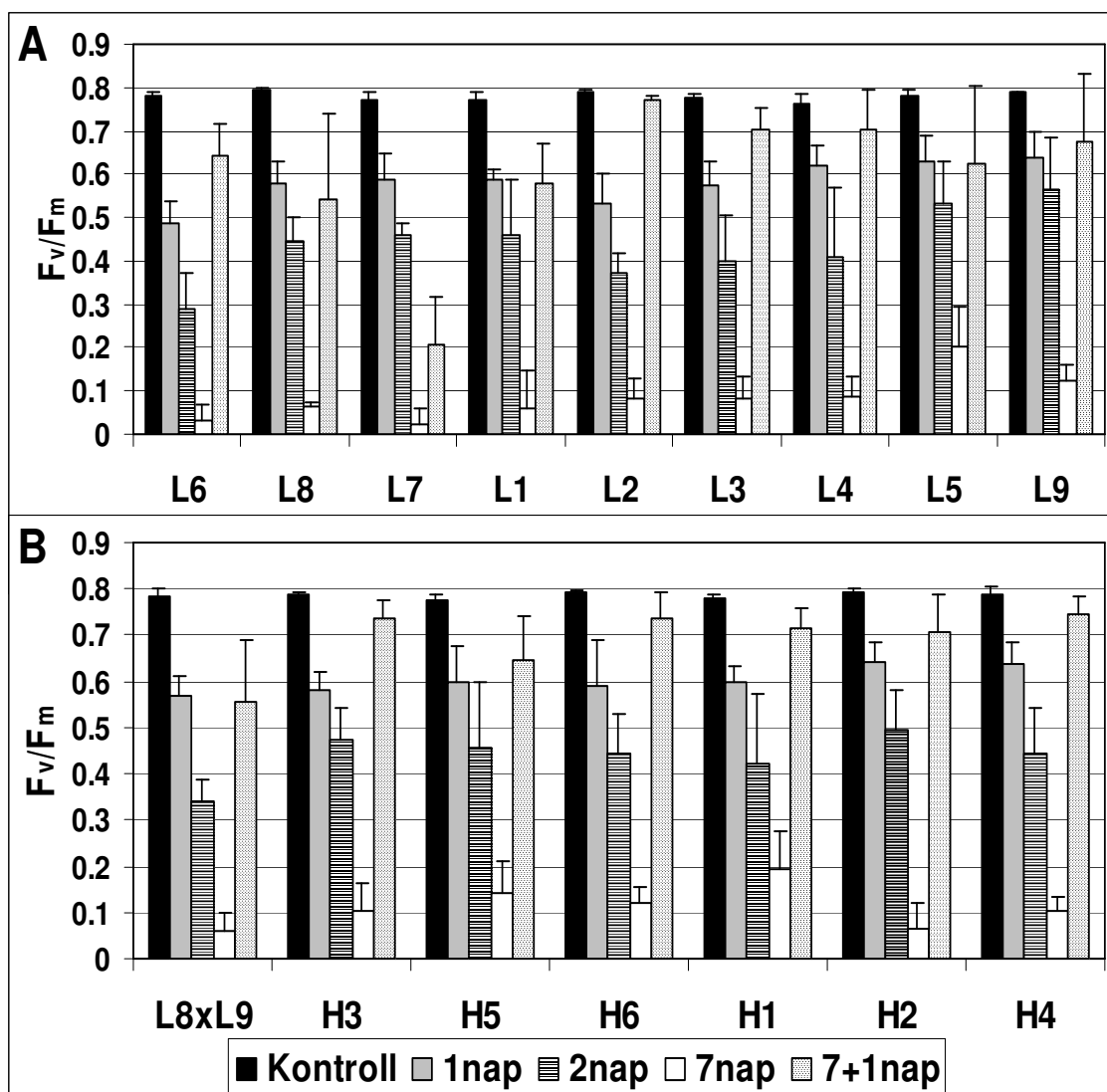
#### ***4.3.2. Alacsony hőmérsékleti stressz hatása kukoricanövények antioxidáns működésére***

Az előzőekben bemutatott kísérletek kiegészítéseképpen vizsgálatokat végeztünk annak eldöntésére, hogy egyrészt az alacsony hőmérséklet hogyan befolyásolja egy szubtrópusi eredetű, ebből következőleg erősen hidegérzékeny gabonaféle, a termesztett kukorica antioxidáns működését, másrészt, hogy van-e közvetlen összefüggés a különböző hidegtűréssel jellemezhető fiatal kukoricavonalak hidegtűrése és antioxidáns enzimeink aktivitása között. Ebben a kísérletben 9 beltenyésztett kukoricavonalat (L1-L9), valamint a belőlük létrehozott hibrideket (H1-H6) vizsgáltunk. (A vonalak kombinációit ld. az Anyagok és módszerek fejezetben).

##### *4.3.2.1. Fiatal kukoricanövények hidegtűrésének jellemzése klorofill-a fluoreszcencia indukcióval*

A kérdés megválaszolásához először a vonalak és hibridek hidegtűrésének mértékét becsültük klorofill fluoreszcencia indukciós módszerrel. Ehhez 3 hetes növényeket 1 héten át alacsony hőmérsékleten, 5 °C-on hidegkezeltünk, majd visszahelyeztük őket normál nevelési hőmérsékletre (22/20 °C). A hidegkezelés 1., 2., és 7. napján, illetve az azt követő 1 napon normál hőmérsékleten (recovery) mértük a PS2 maximális kvantumhatásfokát jellemző  $F_v/F_m$  paramétert (23. ábra).

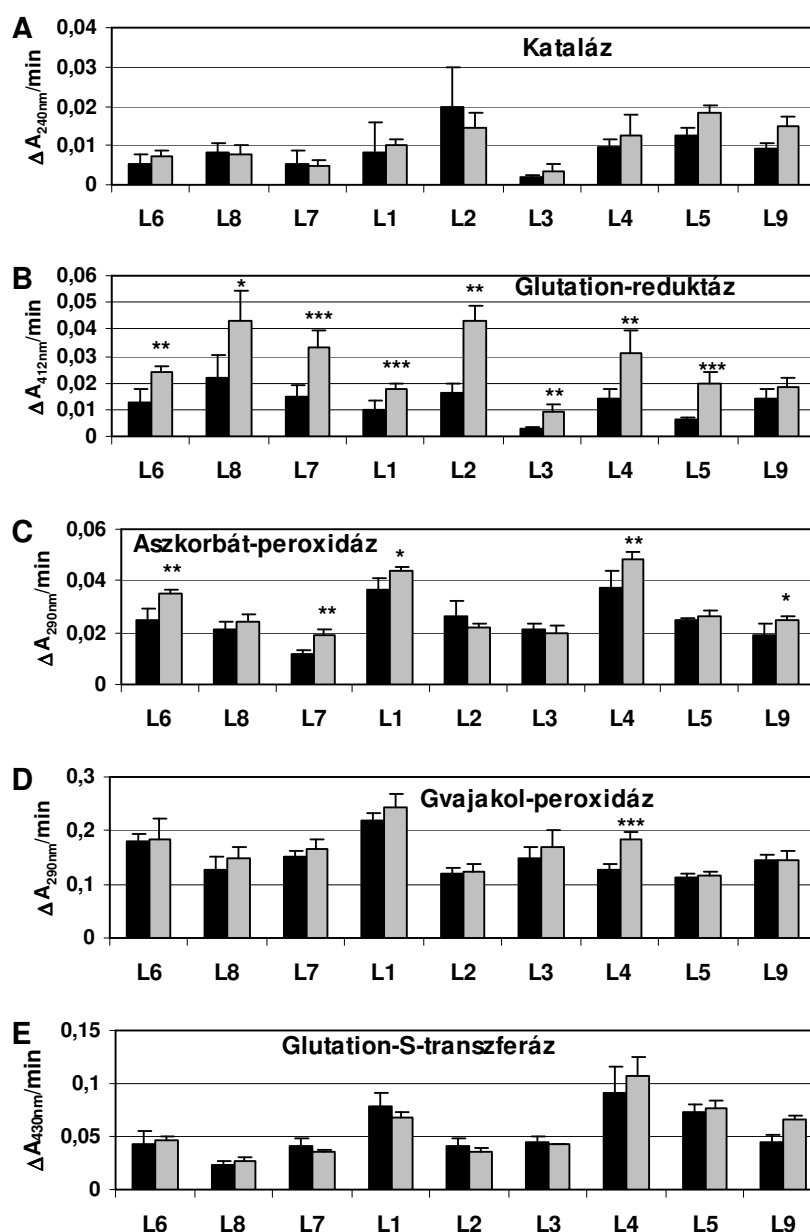
A kontroll növények  $F_v/F_m$  értékei egyöntetűen 0,8 körül voltak, a genotípusok között szignifikáns különbség nem volt. Ahhoz, hogy a növényeket hidegtűrésük szempontjából rangsorolhassuk (külön a hibrideket valamint a vonalakat), a különböző időpontokban mért  $F_v/F_m$  értékek alapján sorbaállítottuk őket, majd a rangsort az egyes időpontokban kapott „helyezések” átlagai adták. Az elvégzett statisztikai elemzés után az L6, L7 és L8 genotípusok gyenge, az L1, L2 és L3 vonalak közepes, a L5 és L9 vonalak jó hidegtűréssel voltak jellemezhetők. A hibridek hidegtűrése nem különbözött egymástól jelentősen, és hasonlóan más szerzők eredményeihez (Körnerová és Holá, 1999; Holá és mtsai., 2003; 2004) elmondható volt, hogy nagymértékben meghaladták a szülő vonalak hidegtűrését.



**23. ábra.**  $F_v/F_m$  klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméter változása fiatal beltenyésztett kukoricavonalakban (A), ill. hibridekben (B). Fekete oszlop: kontroll, szürke oszlop 1 nap, sávozott oszlop 2 nap, fehér oszlop 1 hét hidegkezelés (5 °C) után, pöttyözött oszlop: 1 hét hidegkezelést követő 1 nap regenerációt követően. A vonalakat az  $F_v/F_m$  paraméter által megadott növekvő hidegtűrési sorrendben ábrázoltuk.

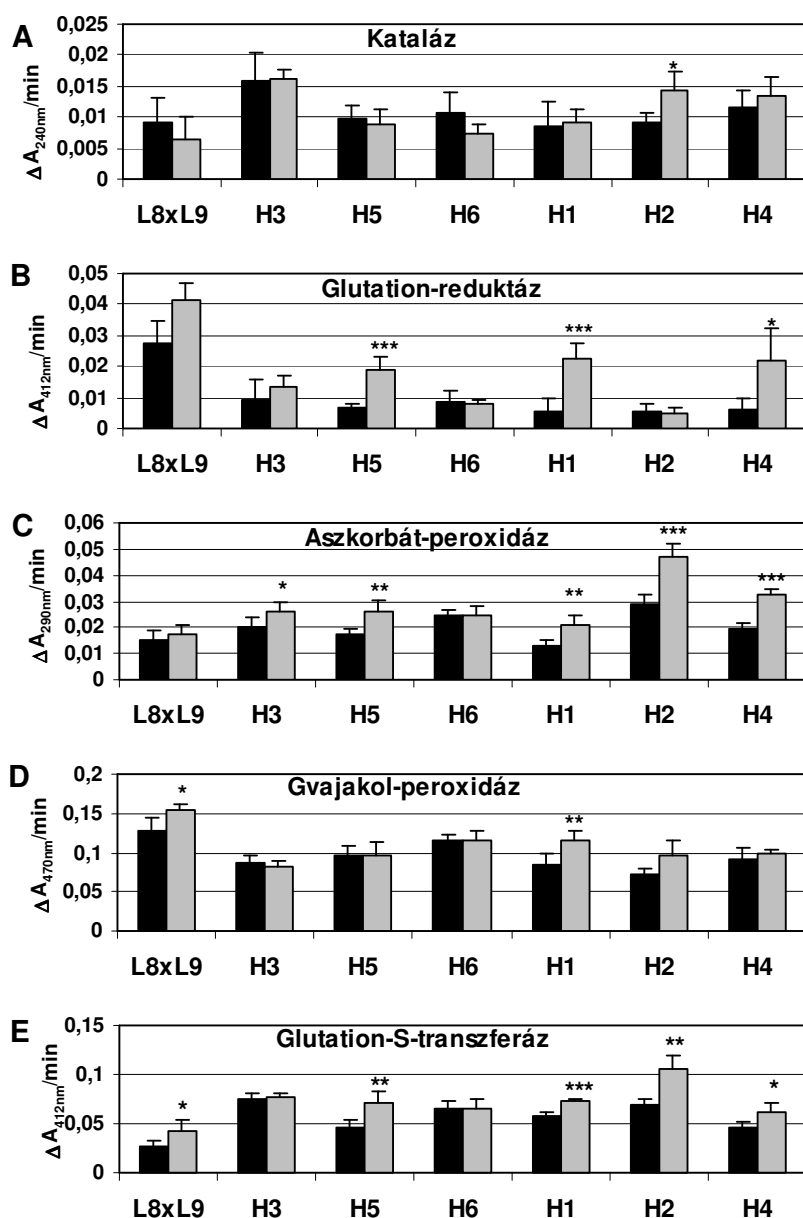
#### 4.3.2.2. Fiatal beltenyésztett kukoricavonalak és hibridek antioxidáns működése

Öt antioxidáns enzim (kataláz, GR, APX, POD és GST) aktivitását vizsgáltuk kontroll és 1 napig 5°C-on hidegkezelt kukoricavonalakban (L1-9; **24. ábra**) és hibridekben (H1-6; **25. ábra**).



**24. ábra.** Kataláz (A), GR (B), APX (C), POD (D) és GST (E) enzimek aktivitásának változása 1 nap 5 °C-os hidegkezelés hatására fiatal, 22/20 °C-on nőtt beltenyésztett kukoricavonalak leveleiben. A vonalakat az  $F_v/F_m$  paraméter által megadott növekvő hidegtűrési sorrendben ábrázoltuk. Kontroll: fekete, hidegkezelés: szürke oszlopok (n=5, \*, \*\*, \*\*\*: szignifikáns különbség a kezelés hatására 0,05, 0,01, ill. 0,001 szinten.)

A katalázaktivitás egyik vonalban sem változott és a hibridek közül is csak a H2-ben változott szignifikánsan az egy napos hidegstressz során. A genotípusok között azonban jelentős eltérés mutatkozott: a vonalak közül az L2, L4 és L5, a hibridek közül a H3 (melynek szülei az előbb említett L2 és L5 vonalak) nagy, a L3 vonal viszonylag alacsony aktivitást mutatott.



**25. ábra.** Kataláz (A), GR (B), APX (C), POD (D) és GST (E) enzimek aktivitásának változása 1 nap 5 °C-os hidegkezelés hatására fiatal, 22/20 °C-on nőtt kukorica hibridek leveleiben. A vonalakat az  $F_v/F_m$  paraméter által megadott növekvő hidegtűrési sorrendben ábrázoltuk. Kontroll: fekete, hidegkezelés: szürke oszlopok. (n=5, \*, \*\*, \*\*\*: szignifikáns különbség a kezelés hatására 0,05, 0,01, ill. 0,001 szinten.)

A GR aktivitás az L9-en kívül az összes vonalban, valamint a hibridek közül a H5, H1 és H4-ben jelentősen megnőtt alacsony hőmérsékleten. Az L3 genotípus GR aktivitása a katalázhoz hasonlóan jelentősen kisebb volt, mint a többi vonalé, a hibridek közül viszont az L8xL9 mutatott kiemelkedően nagy aktivitást mind a hidegkezelés előtt, mind azután.



A kontroll növények közül az L1 és L4 vonalakban az APX aktivitás volt a legnagyobb. Hidegkezelés hatására az L1, L4, L6 és L7 vonalakban kismértékű növekedés volt megfigyelhető. A hibridek közül a H3, H5, H1, H4 és H2, mely utóbbi aktivitása jelentős mértékben meghaladta a többiét, mutattak APX aktivitásnövekedést az 1 napos 5°C-os hidegkezelés hatására. Alacsony hőmérséklet hatására bekövetkező GR és APX aktivitás-emelkedést más kukoricagenotípusokban is kimutattak már (Takáč és mtsai., 2003).

A legmagasabb POD aktivitást az L1 vonal mutatta, de hidegkezelésre csak az L4 vonalban, ill. a H1, és L8xL9 hibridekben nőtt meg kismértékben az aktivitás.

A GST aktivitás relatíve nagy volt az L1, L4 és L5 vonalakban, de szignifikáns változás egyikben sem volt kimutatható. Ezzel szemben kismértékű, de statisztikailag igazolható GST növekedést mutattak a L8xL9, a H5, H1, H2 és H4 hibridek. Az L4 vonal nagy APX és GST aktivitása magyarázhatja, hogy a H2 hibrid nagy APX és GST aktivitását is.

A előbbi vizsgálatokat olyan kísérletekkel egészítettük ki, amelyek segítségével azt vizsgáltuk, hogy a fiatal kukoricánövények antioxidáns válaszreakcióit a hideghatás mértéke mennyiben befolyásolja. Ehhez a fentiek közül két vonalat (L3, L4) és hibridjüket (H2) választottunk modellként, és vizsgáltuk bennük a GR aktivitást enyhe (1 nap, 15/13 °C), és drasztikus (1 hét 5 °C) hidegkezelés hatására. Ezen enzim aktivitása már igen enyhe alacsony hőmérsékleti hatás következtében a H2 és L4 genotípusokban jelentősen, közel kétszeresére, az L3-ban kismértékben (statisztikus nem szignifikánsan) megnőtt. Ezzel szemben 1 hét 5 °C-os hideghatás után az aktivitás nemhogy nem volt magasabb, hanem a leghidegérzékenyebb fajtában még jelentősen, mintegy a felére le is csökkent (adatok nincsenek bemutatva).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy bár a hideghatásra megnövekedett antioxidáns aktivitás hozzájárul az alacsony hőmérsékleti stressz okozta oxidatív károsodás mértékének csökkentéséhez, a vizsgált kukoricagenotípusok hidegtűrése és az egyes antioxidáns enzimeinek aktivitása között nincs szoros, közvetlen kapcsolat (Janda és mtsai., 2005a,b).

#### *4.3.3. Környezeti tényezők hatása gabonafélék fagyállóságának kialakulásában*

A következő kísérletsorozatban a megvilágításnak az őszi búza fagyállóságát befolyásoló hatását vizsgáltuk. Először Mv Emese búzafajtát neveltünk 10 napig kontroll körülmények között (20/18 °C), majd a növények egy része alacsony hőmérsékleten (5 °C) edződött tovább 12 napig vagy normál megvilágítás (PPFD = 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), vagy alacsony fényintenzitás (PPFD = 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mellett. A növények másik része vagy

kontroll körülmények között maradt, vagy 20/18 °C-on magasabb megvilágításra került (PPFD = 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A 12 napos edzést követő fagyteszt eredményeit mutatja a 7. táblázat.

**7. táblázat.** 20/18 °C-on normál PPFD mellett (250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , NL) nőtt kontroll, valamint 12 napig alacsony hőmérsékleten (5°C) normal fényen vagy 5°C-on alacsony PPFD mellett (20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , LL), ill. normál hőmérsékleten nagy PPFD (500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , HL) mellett edződött őszi búza növények (Mv Emese) túlélési százaléka 1 nap -10 °C vagy -12 °C-on végzett fagyasztás után. (Átlag $\pm$ SD, n=4.)

Kezelés	Fagyasztás utáni túlélési %	
	-10 °C	-12 °C
<b>Kontroll</b>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
<b>20/18 °C HL</b>	57 $\pm$ 33	1 $\pm$ 1
<b>5 °C NL</b>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
<b>5 °C LL</b>	35 $\pm$ 8	1 $\pm$ 1

Az eredményekből látszik, hogy a fagyállóság mértéket nemcsak az edzési hőmérséklet, hanem a megvilágítás is jelentősen befolyásolja: egyrészt az alacsony hőmérsékleten végrehajtott edzés lényegesen hatékonyabb volt normál megvilágítás mellett, másrészt részleges fagyállóságot el lehet érni normál hőmérsékleten is, ha a nevelési fényintenzitást megemeljük. Ezeket az eredményeket két fagyasztási hőmérsékleten (-10 és -12 °C) végrehajtott tesztekkel erősítettük meg. Mindezek után arra kerestünk választ, hogy a fény milyen biokémiai, élettani folyamatokon keresztül járul hozzá a fagyállóság kialakulásához.

#### 4.3.3.1. Klorofill-a fluoreszcencia indukció

Az egyes klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterek változásait különböző körülmények közt történő hidegedzés során a 8. táblázat mutatja. Fényben 5 °C-on kismértékű csökkenést mutatott a PS2 maximális kvantumhatásfokát jelző  $F_v/F_m$  paraméter, ami arra utal, hogy ezek a növények az edzés alatt fotoinhibíciót is szenvedtek. Sötétben ilyen változás nem volt. Hasonló tendenciát mutatott az aktuális kvantumhatásfokot jelző  $\Delta F/F_m'$  ( $\Delta F = F_m' - F_s$ ), valamint a fotokémiai kioltás ( $q_p$ ) is. Ezen paraméterek összehasonlításánál

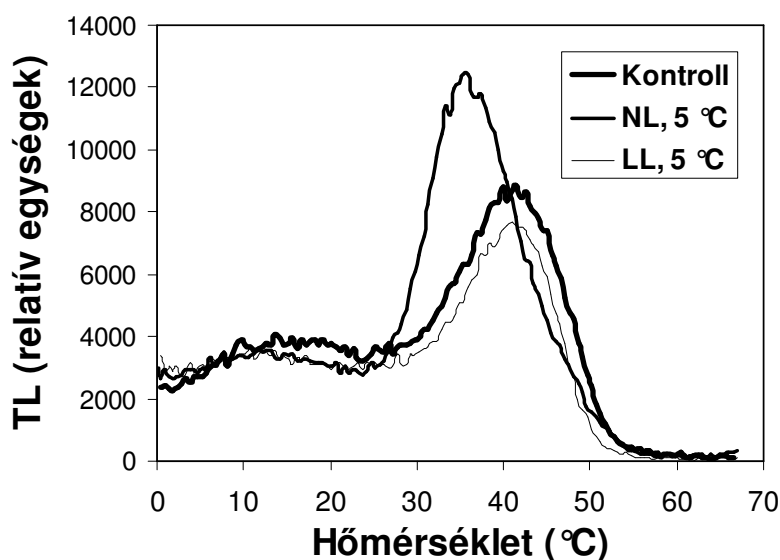
azonban figyelembe kell venni, hogy a mérési körülmények csupán az  $F_v/F_m$  paraméternél standardok (sötétadaptált állapot, és ilyen tartományban a hőmérsékletfüggés elhanyagolható), az utóbbi két paraméterben kapott különbségek nemcsak az „előéleti”, vagyis az eltérő fény- és hőmérsékleti viszonyokból is adódnak. A nem-fotokémiai kioltás ( $q_N$ ) fényben történő edzés során jelentősen, alacsony fényintenzitásnál nem szignifikánsan magasabb volt (8. táblázat).

**8. táblázat.** Klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterek változása edzetlen kontroll, normál ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; NL) és alacsony megvilágítás ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; LL) mellett edzett Mv Emese búzanövényekben. \*, \*\*\*: szignifikáns különbség a kontroll növényekhez képest 0,05 és 0,001 szinten. ns: nem szignifikáns.

	Edzetlen (kontroll)	NL edzett	LL edzett
$F_v/F_m$	0,813 ( $\pm 0,003$ )	0,757 ( $\pm 0,029$ )**	0,817 ( $\pm 0,004$ ) <sup>ns</sup>
$\Delta F/F_m'$	0,611 ( $\pm 0,051$ )	0,429 ( $\pm 0,074$ ***)	0,741 ( $\pm 0,020$ ***)
$q_P$	0,824 ( $\pm 0,033$ )	0,698 ( $\pm 0,066$ )**	0,948 ( $\pm 0,019$ ***)
$q_N$	0,187 ( $\pm 0,148$ )	0,536 ( $\pm 0,144$ ***)	0,297 ( $\pm 0,085$ ) <sup>ns</sup>

#### 4.3.3.2. Termolumineszcencia mérések

A következőkben a távoli vörös fény által indukált termolumineszcencia sáv alakulását vizsgáltuk kontroll és edzett búzanövényekben. A kontroll, 20/18 °C-on nőtt növényekben az AG-sáv csúcshőmérséklete 41 °C körül volt. Normál megvilágítás mellett ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 12 napig hidegedzett (5 °C) növényekben a sáv alacsonyabb hőmérsékletre, 36 °C-ra tolódott el. Alacsony megvilágítás ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mellett történő edzés során mindez nem volt megfigyelhető, az AG-sáv csúcshőmérséklete a kontroll, edzetlen növényekével megegyező volt. (26. ábra).



**26. ábra.** Különböző megvilágítási körülmények (normál,  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , NL; és alacsony  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  megvilágítás, LL) közötti alacsony hőmérsékleti edzés ( $5^\circ\text{C}$ ) hatása 30 s távoli vörös fényel gerjesztett TL görbére Mv Emma őszi búzafajtában.

#### 4.3.3.3. P700 mérések

A P700 oxidációs állapotának tanulmányozásához a sötétadaptált leveleket először 50 s-ig FR fényel világítottuk meg. Előkísérletekből tudjuk, hogy a vizsgált mintákban ez az idő elegendő a P700 redox állapotának stabilizációjához. Ennek megfelelően követtük nyomon a sötétben történő re-redukció kinetikáját, mely kétkomponensű exponenciális görbével jól illeszthetőnek bizonyult. Ha a különböző körülmények közt edzett búzanövényekben kapott exponenciálisok időkomponenseit összehasonlítjuk, látható, hogy a fényben történő hidegedzés hatására a re-redukció mértéke felgyorsul. Alacsony megvilágítás mellett végzett edzés hatására a gyors komponens időállandója nem változott, a lassú komponensé pedig megnőtt (**9. táblázat**).

**9. táblázat.** P700 sötétben történő re-redukciójának gyors és lassú időkomponensei 50s FR megvilágítás után kontroll, normál ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; NL) és alacsony megvilágítás ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; LL) mellett edzett Mv Emese búzanövényekben. \*, \*\*\*: szignifikáns különbség a kontroll növényekhez képest 0,05 és 0,001 szinten. ns: nem szignifikáns.

	Edzetlen (kontroll)	NL edzett	LL edzett
<b>t-gyors</b>	1,41 ( $\pm 0,21$ )	0,86 ( $\pm 0,03$ )*	1,34 ( $\pm 0,11$ ) <sup>ns</sup>
<b>t-lassú</b>	6,27 ( $\pm 1,41$ )	4,44 ( $\pm 0,12$ )*	17,9 ( $\pm 1,14$ )**

#### 4.3.3.4. A megvilágítás hatása az alacsony hőmérsékleti edzés során bekövetkező zsírsavösszetétel változásra őszibúzában

A **10. táblázat** mutatja a foszfatidilglicerol (PG) zsírsavösszetételének változásait különböző megvilágítás melletti fagyállósági edzés során Mv Emese őszi búzafajtában. A legkifejezettebb változás a hexadekánsav-összetételben következett be. Levelekben ez a lipid nemcsak telített, hanem transz helyzetű egyszeresen telítetlen formában is előfordul. Ennek aránya (t16:1/16:0) alacsony hőmérsékleti edzés során jelentősen lecsökkent. A csökkenés mértéke fényben nagyobb volt, mint sötétben, sőt magas fényintenzitás mellett normál hőmérsékleten is bekövetkezett. A C-18-as zsírsavak telítetlenségi foka ebben a lipidosztályban nem változott számottevően.

**10. táblázat.** 20/18°C-on normál PPFD mellett ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , NL) nőtt kontroll, valamint 12 napig alacsony hőmérsékleten (5°C) normal fényen vagy 5°C-on alacsony PPFD mellett ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , LL), ill. normál hőmérsékleten nagy PPFD ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , HL) mellett edződött őszi búzanövények (Mv Emese) PG lipidfrakciójának zsírsavösszetétele. DBI = kettőskötésindex. (Átlag $\pm$ SD, n=5. \*, \*\*, \*\*\* szignifikáns eltérés a kontroll értéktől  $p \leq 0,05$ , 0,01 vagy 0,001 szinten)

Kezelés	% 16:0	% t16:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% 18:3	DBI
<b>Kontroll</b>	19,98 $\pm$ 2,24	19,47 $\pm$ 0,86	1,31 $\pm$ 0,61	1,38 $\pm$ 0,48	6,64 $\pm$ 0,23	51,21 $\pm$ 2,04	168,3 $\pm$ 6,1
<b>20/18°C HL</b>	25,94 $\pm$ 3,33*	15,76 $\pm$ 3,22*	0,95 $\pm$ 0,09	1,34 $\pm$ 0,07	7,91 $\pm$ 0,81*	48,11 $\pm$ 1,24*	161,5 $\pm$ 3,5
<b>5 °C NL</b>	25,94 $\pm$ 1,36***	12,80 $\pm$ 0,96***	0,80 $\pm$ 0,25	1,07 $\pm$ 0,09	7,98 $\pm$ 0,50***	51,41 $\pm$ 0,65	171,3 $\pm$ 1,3
<b>5 °C LL</b>	28,67 $\pm$ 4,60**	13,81 $\pm$ 3,12**	1,17 $\pm$ 0,59	0,72 $\pm$ 0,31*	6,12 $\pm$ 0,59	49,52 $\pm$ 2,23	161,5 $\pm$ 6,1

A foszfatidil-etanolamin (PE) lipidosztály zsírsavösszetételének változását tanulmányozva megállapíthatjuk, hogy az általunk alkalmazott edzési körülmények között szignifikáns változás csak akkor következett be, amikor az edzés alacsony hőmérsékleten és fényben történt (**11. táblázat**). Ebben az esetben mind a 16:0, mind a 18:0 zsírsavak részaránya mintegy 30%-kal csökkent, a 18:3 zsírsav részaránya viszont megnőtt, ami jelentős változást eredményezett a telítetlenségi indexben is.

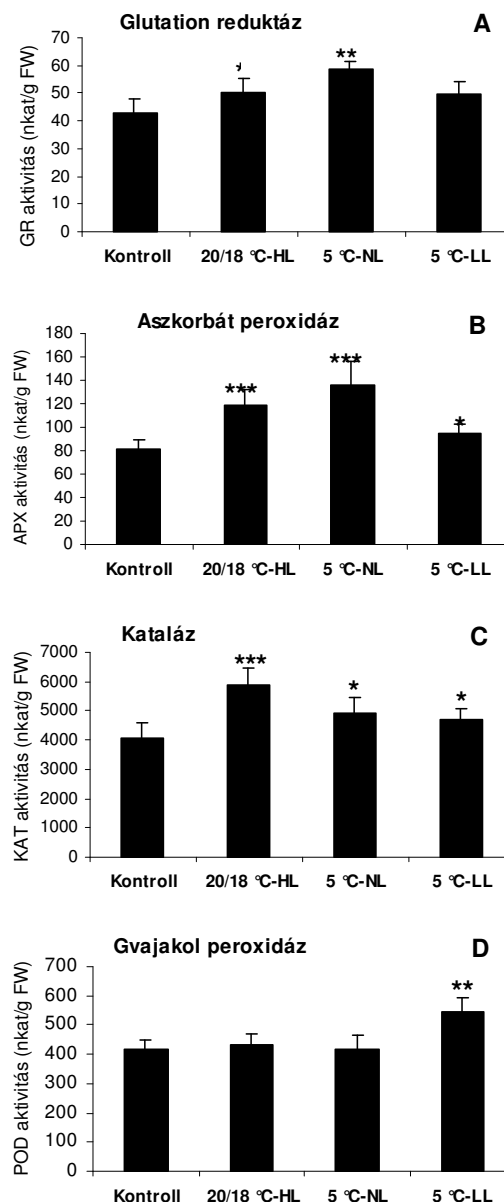
Más vizsgált lipidosztályokban, mint pl. monogalaktozil-diacil-glicerid (MGDG), vagy digalaktozil-diacil-glicerid (DGDG) szignifikáns változást nem tapasztaltunk (adatok nincsenek bemutatva).

**11. táblázat.** 20/18 °C-on normál PPFD mellett ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , NL) nőtt kontroll, valamint 12 napig alacsony hőmérsékleten (5°C) normal fényen vagy 5°C-on alacsony PPFD mellett ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , LL), ill. normál hőmérsékleten nagy PPFD ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , HL) mellett edződött őszi búzanövények (Mv Emese) PE lipidfrakciójának zsírsavösszetétele. DBI = kettőskötésindex. (Átlag $\pm$ SD, n=5. \*, \*\*, \*\*\* szignifikáns eltérés a kontroll értéktől  $p \leq 0,05$ , 0,01 vagy 0,001 szinten)

Kezelés	% 16:0	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% 18:3	DBI
<b>Kontroll</b>	30,51 $\pm$ 2,07	1,87 $\pm$ 0,30	1,97 $\pm$ 0,15	31,29 $\pm$ 1,92	34,36 $\pm$ 4,28	167,6 $\pm$ 9,0
<b>20/18°C HL</b>	28,20 $\pm$ 1,26	2,25 $\pm$ 0,97	2,19 $\pm$ 0,47	29,08 $\pm$ 2,09	38,28 $\pm$ 3,54	175,2 $\pm$ 7,1
<b>5 °C NL</b>	20,16 $\pm$ 1,80 ***	1,06 $\pm$ 0,46 *	1,63 $\pm$ 0,67	28,83 $\pm$ 4,27	48,32 $\pm$ 5,74 **	204,3 $\pm$ 9,2 ***
<b>5 °C LL</b>	27,77 $\pm$ 2,23	1,54 $\pm$ 0,66	1,64 $\pm$ 0,44	29,78 $\pm$ 2,22	39,27 $\pm$ 3,25	179,0 $\pm$ 8,2

#### 4.3.3.5. Az edzés alatti megvilágítás hatása őszibúza antioxidáns aktivitására

Az antioxidáns aktivitás kimutatása céljából 5 fontos antioxidáns enzim aktivitásának változását vizsgáltuk edzés során. A **27. ábra** mutatja, hogy alacsony hőmérsékleti edzés (5 °C) során 12 nap után kismértékű, de statisztikailag szignifikáns emelkedés volt a GR enzim aktivitásában. Ezen emelkedésnek a mértéke alacsony megvilágítás mellett nem volt szignifikáns. Hasonló jellegű változás mutatható ki az APX enzim aktivitásában is. Ennél azonban emelkedés volt tapasztalható akkor is, amikor alacsony hőmérsékleten, alacsony fényintenzitáson edződtek a növények. A kataláz enzim aktivitása mindhárom esetben kismértékben, de statisztikailag szignifikánsan megnőtt. Mindezen enzimekkel szemben a POD enzim aktivitása abban az esetben nőtt meg, amikor az edzés alacsony hőmérsékleten, alacsony fényintenzitás mellett zajlott. A SOD enzim aktivitása egyik esetben sem mutatott szignifikáns változást (adatok nincsenek bemutatva).

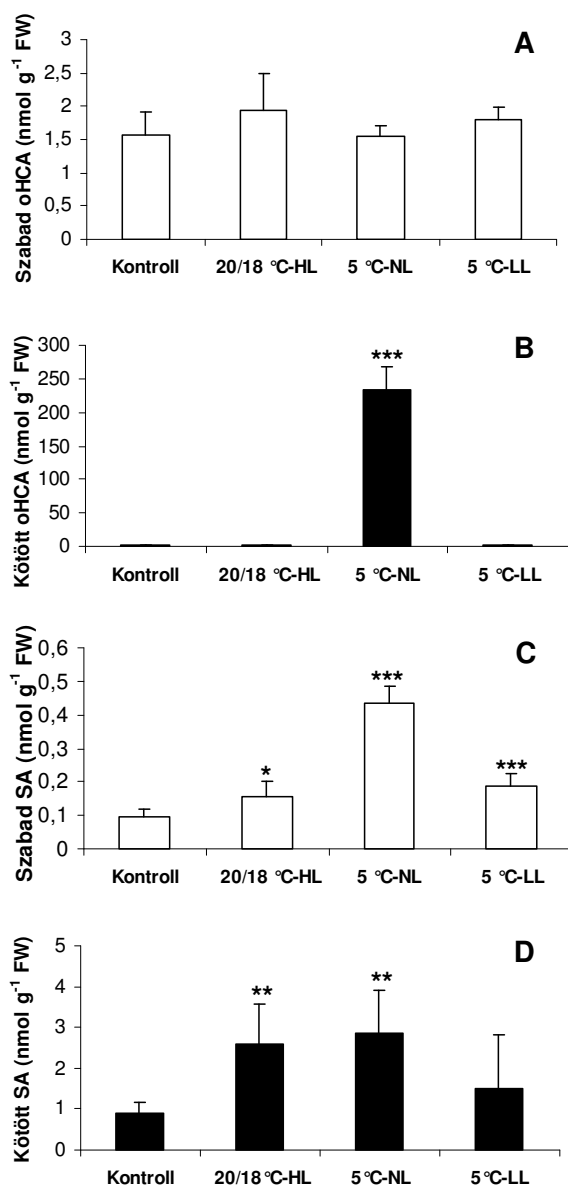


**27. ábra.** 20/18 °C-on normál PPFD mellett ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , NL) nőtt kontroll, valamint 12 napig alacsony hőmérsékleten (5°C) normal fényen vagy 5°C-on alacsony PPFD mellett ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , LL), ill. normál hőmérsékleten nagy PPFD ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , HL) mellett edződött őszi búzanövények (Mv Emese) egyes antioxidáns enzimeinek aktivitására. (Átlag $\pm$ SD, n = 5. \*, \*\*, \*\*\* szignifikáns eltérés a kontroll értéktől  $p \leq 0,05$ , 0,01 vagy 0,001 szinten.)

#### 4.3.3.6. A hidegedzés és a megvilágítás hatása az őszi búza szalicilsav metabolizmusára

Az előzőekben bemutatott mintákból meghatároztuk a szalicilsavnak és az egyik lehetséges előanyagának, az *orto*-hidroxi-fahéjsavnak a mennyiségét is (**28. ábra**). A szabad *orto*-hidroxi-fahéjsav (oHCA) mennyisége mind a négyfajta mintában közel azonos volt. Ezzel szemben a kötött forma mennyisége nagyságrendekkel megnőtt abban az esetben,

amikor az edzés alacsony hőmérsékleten, normál megvilágítás mellett zajlott. Egyéb esetekben, tehát alacsony megvilágítás mellett, vagy nagy fénynél normál hőmérsékleten ilyen változás nem volt kimutatható. Ezzel szemben a szalicilsav mennyisége mind szabad, mind kötött formában megnőtt nemcsak alacsony hőmérsékletű, fényben történő edzés során, hanem normál hőmérsékleten magas fényintenzitás mellett is. A szabad szalicilsav mennyiségének növekedése statisztikailag szignifikáns volt kis fényintenzitás mellett történő hidegedzés során is.



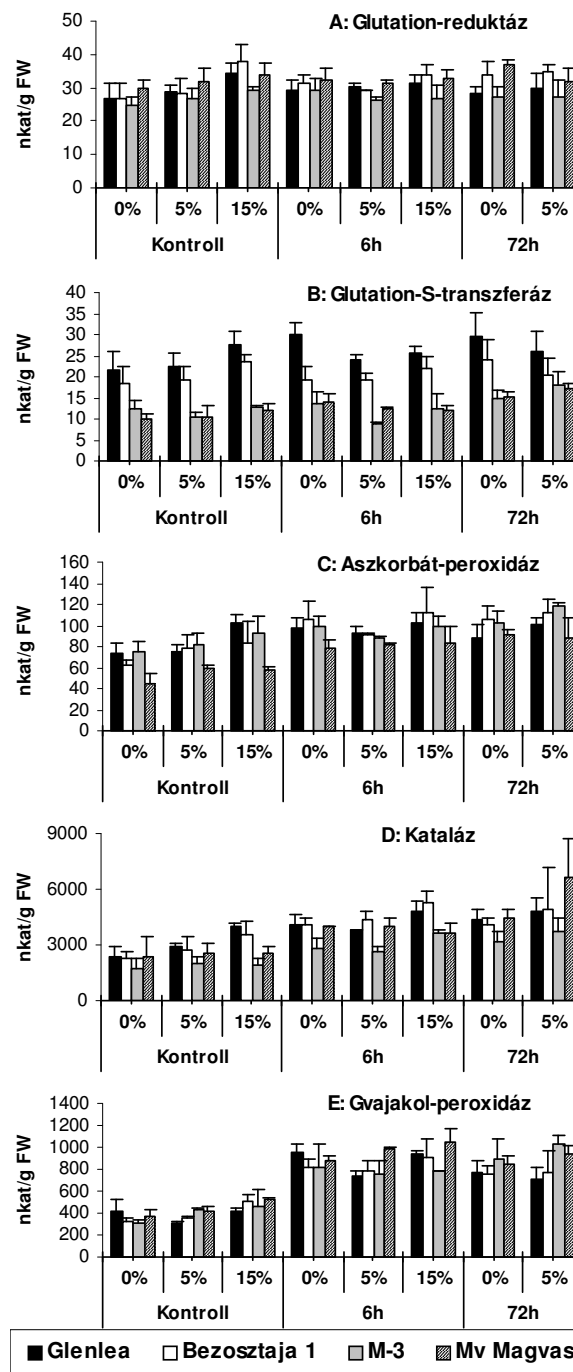
**28. ábra.** 20/18 °C-on normál PPFD mellett ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , NL) nőtt kontroll, valamint 12 napig alacsony hőmérsékleten (5°C) normal fényen vagy 5°C-on alacsony PPFD mellett ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , LL), ill. normál hőmérsékleten nagy PPFD ( $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , HL) mellett edződött őszi búzanövények (Mv Emese) szalicilsav-metabolizmusa (**A**: szabad oHCA; **B**: kötött oHCA, **C**: szabad szalicilsav, **D**: kötött szalicilsav) (Átlag $\pm$ SD, n = 5; \*, \*\*, \*\*\* szignifikáns eltérés a kontroll értéktől  $p \leq 0,05$ , 0,01 vagy 0,001 szinten.)



#### 4.3.4. Szárazság és gombafertőzés együttes hatása búza növények antioxidáns aktivitására

A következő kísérletben öt antioxidáns enzim, a GR, GST, APX, kataláz és POD aktivitását vizsgáltuk kis (5%) és nagy koncentrációjú (15%) PEG-kezelés, két időpontban végrehajtott *Drechslera tritici-repentis* Died. (DTR) patogén-gomba fertőzés, valamint ezek kombinációinak hatására. Meg kell jegyezni, hogy azon növények esetében, amikor a DTR fertőzést már 3 nappal megelőzte a PEG kezelés a kombinált stresszhatás olyan drasztikus változásokat hozott, hogy a 15% PEG koncentrációval kezelt növényekből már enzimméréshez használható mintákat nem lehetett szedni, így ezeknél a növényeknél csak az 5% PEG hatásait mutatjuk be (29. ábra).

A GR enzim aktivitása kontroll körülmények között nem különbözött jelentősen a vizsgált fajtákban. Nagy koncentrációjú PEG-kezelés hatására is csak kismértékű, de statisztikailag szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az M-3 és Bezostaja 1 genotípusokban. A DTR fertőzésnek a legtöbb esetben ezen enzim aktivitására nem volt jelentős hatása. Kismértékű emelkedést tapasztaltunk a PEG-kezelés nélküli M-3 fajtában a 6 órás és az Mv Magvas és Bezostaja 1 fajtákban a 72 órás fertőzés hatására, valamint az 5%-os PEG-kezelt, a 6 órás fertőzött Bezostaja 1 esetében. A GST enzim aktivitása nagymértékű variabilitást mutatott az egyes fajták között, azonban mivel a legmagasabb értéket a Glenlea és a Bezostaja 1 fajták mutatták, nem magyarázható ezzel az M-3 és Mv Magvas DTR toleranciája. A különböző PEG és DTR kezelések során néhány esetben statisztikailag igazolható változás volt kimutatható, de a fajták közti kezdeti különbségek megmaradtak. PEG-kezelés nélkül a fertőzés hatására a GST enzim aktivitása a Glenlea és Mv Magvas fajtákban emelkedett meg. 72 órás fertőzés és kis koncentrációjú PEG-kezelés hatására az Mv Magvas mellett az M-3 fajta GST aktivitása is nőtt. A vizsgált fajták közül az Mv Magvas APX aktivitása mind a kontroll, mind a csupán PEG-kezelt mintákban jelentősen kisebb volt, mint a többi fajtáé. Amíg a PEG-kezelés önmagában nem okozott jelentős változást az APX aktivitásban, DTR fertőzés hatására valamennyi vizsgált fajtában jelentős indukció volt megfigyelhető. A fertőzött mintákban a fajták közti különbség is csökkent. Az APX enzimhez hasonlóan a kataláz aktivitása is jelentős emelkedést mutatott már a kevésbé drasztikus fertőzés hatására is. 15%-os PEG-kezelés önmagában statisztikailag szignifikáns változást okozott a Glenlea és a Bezostaja-1 fajtákban. A DTR fertőzés az APX-hez hasonlóan valamennyi fajtában enzimaktivitás-növekedést okozott. A legnagyobb mértékű változás a DTR-kezelt növények POD aktivitásában volt kimutatható.

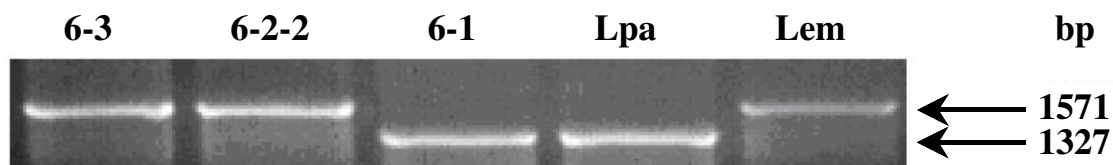


**29. ábra.** Különböző koncentrációjú PEG-gel indukált szárazság és *Drechslera tritici-repentis* (DTR) fertőzés hatása egyes antioxidáns enzimekre búzánövényekben.

A PEG-kezelés önmagában csupán kismértékű változást okozott: statisztikailag igazolható emelkedést mutatott az M-3 fajta 5 és 15%, valamint a az Mv Magvas és Bezosztaja 1 fajták 15%-os PEG-kezelés hatására. A DTR hatására azonban már kismértékű fertőzés esetén is a POD aktivitás mind a PEG-kezelt, mind a kezeletlen növények esetében több, mint kétszeresére emelkedett.

#### 4.4. Az aszkorbát-peroxidáz molekuláris genetikai vizsgálata paradicsomban

Irodalmi adatokból és az előzőekből is egyértelmű, hogy az APX a növényekben kulcsszerepet játszik a különböző típusú stresszörülmények között felhalmozódott reaktív oxigénformák közömbösítésében. Emiatt munkánk során kitüntetett szerepet kapott az APX-ok molekuláris genetikai jellemzése is. Ebben az alfejezetben a paradicsom APX gének genetikai térképezésével kapcsolatos vizsgálatok egy részét ismertetem. Mindehhez kétféle paradicsomfajt, a termesztett *Lycopersicon esculentum*-ot, valamint a vad fajt, a *Lycopersicon pennellii*-t használtuk fel. Első megközelítésben egy citoszolikus típusú APX (*LeApx1*) közölt (Gadea és mtsai., 1999) szekvenciájának ismeretében mindkét fajból izoláltuk az adott génszakaszt. Vizsgálataink azt mutatták, hogy míg a kódoló régiók a két fajban nagyfokú homológiát mutatnak (95-100%), addig az intron régiók közt ez a homológia lényegesen kisebb. Eltérés mutatkozott több restriktációs enzim felismerőhelyében, valamint számos egynukleotidos eltérés (*single nucleotids polymorphysm*, SNP) mellett nagyméretű deléciók is előfordultak. A legnagyobb mérvű különbséget a *Lycopersicon pennellii* II. intronjában talált 244 bp méretű deléció jelentette. Ez az információ lehetőséget adott arra, hogy a különböző introgressziós vonalak (Eshed és Zamir, 1994, 1995) felhasználásával a deléciót hordozó génszakaszt mint fajspecifikus próbát felhasználva a *LeApx1* gént térképezzük (30. ábra).



**30. ábra.** *LeApx1* génszakaszok azonosítása PCR-rel vad és termesztett paradicsomfajokban, ill. introgressziós vonalakban. Lem: *Lycopersicon esculentum* Mill. cultivar M82; Lpa: *L. pennellii* (Corr.). A megfelelő vonalak ill. használt primerek leírását ld. Az Anyagok és módszerek fejezetben.

Megfelelő primerek tervezése után (ld. Anyagok és módszerek 3.10 alfejezet) PCR reakciókkal kimutattuk, hogy a *LeApx1* gén a paradicsom 6-os kromoszómájának disztális végén helyezkedik el. A későbbi vizsgálatokban hasonló elven további 6 paradicsom Apx gént is sikerült térképezni (Najami és mtsai. 2003, 2007).

## 5. Az eredmények megvitatása

### 5.1. Szalicilsavszármazékok stressztűrést fokozó hatásainak vizsgálata

Ma már egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a szalicilsav nemcsak biotikus, hanem abiotikus stresszfolyamatokban is fontos szabályozó szerepet játszik. Egyrészt a külsőleg adott szalicilsavról mutatták ki, hogy különböző abiotikus stresszek ellen védő hatása van, másrészt több stresszfaktor befolyásolja az endogén szalicilsavszintet is. Korábban fluoreszcencia indukciós és ionkiáramlás mérésekkel kimutattuk, hogy fiatal kukoricanövények tápoldatához adott szalicilsavval azok hidegtűrését fokozni lehetett (Janda és mtsai., 1997, 1999a; Szalai, 1997a). Később az előbbi eredményeket az etilén prekursorának az 1-aminociklopropán-1-karboxilsavnak (ACC) a hideghatásra történő változásával is megerősítettük (Szalai és mtsai., 2000). Ezek után arra kerestünk választ, hogy ez a hatás mennyire általános a rokon szerkezetű vegyületek között. Az első kísérletsorozatban két rokon vegyületet, az egyik lehetséges prekuzort, a benzoetsavat, illetve az aszpirin néven jól ismert származékot, az acetil-szalicilsavat vizsgáltuk. Ez utóbbiról szintén ismert, hogy képes a szisztémikus szerzett rezisztenciát (SAR) aktiválni (Durner, és mtsai., 1997), ill. dohány növények esetében termotoleranciát indukálni (Lopez-Delgado és mtsai., 1998). Ionkiáramlás-mérésekkel kimutattuk, hogy nemcsak a szalicilsav, hanem mind a benzoetsav, mind az aszpirin előkezelés jelentős védelmet nyújtott a hidegstressz ellen. Későbbi vizsgálataink során egyéb rokon vegyületről, mint pl. az o-hidroxifahéjsavról (oHCA) is bebizonyosodott, hogy hasonló módon alkalmazva védelmet nyújt a hidegstressz ellen (Horváth és mtsai., 2002; Horváth, 2004). Ezzel szemben bizonyos vegyületek, mint pl. a szulfo-szalicilsav, vagy a p-hidroxibenzoetsav hatástalannak bizonyultak, ami cáfolja egyes szerzők elképzeléseit, miszerint valamennyi benzoetsav alapú vegyület képes lenne a szalicilsavhoz hasonló hatás kifejtésére (Senaratna és mtsai., 2003). Az olyan vegyületekről, melyek a szalicilsavhoz hasonlóan védelmet nyújtottak az alacsony hőmérsékleti stressz ellen kukoricában, rendre bebizonyosodott, hogy csökkentik a katalázaktivitást. Az azonban, hogy a kémiai szerkezet hogyan befolyásolja az adott vegyület „szalicilsavszerű” hatását, egyelőre nem ismert.

A szalicilsav katalázgátló hatását először dohányban mutatták ki (Chen és mtsai., 1993b), majd számos más növény esetében (*Arabidopsis*, paradicsom, uborka, dohány) is igazolták ugyanezt, ellenben bizonyos növényfajokban, mint például a rizs és a kukorica, nem

minden esetben tudtak egyértelmű gátlást kimutatni (Sánchez-Casas és Klessig, 1994). Kukorica kataláz2 izoenzim *in vitro* aktivitásában a szalicilsav 1 mM koncentrációban csak kismértékű gátlást (9%) váltott ki (Guan és Scandalios, 1995). Enzimkinetikai vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy kukorica (*Zea mays* L. Norma hibrid) leveléből kivont kataláz aktivitása gátolható szalicilsavval: 2 mM szalicilsav 26% vegyes típusú gátlást eredményezett (Horváth és mtsai., 2002). Az egyes fajok ill. fajon belüli eltérő genotípusok között megfigyelt különbség magyarázatára felmerült a kérdés, hogy az izoenzimek szalicilsav-érzékenysége különbözik-e? Eredményeink azt mutatják, hogy míg a kukorica kataláz1 izoenzimének aktivitásában 2 mM szalicilsav nagymértékű nem-kompetitív gátlást eredményezett, addig a kataláz2 aktivitását a szalicilsav lényegesen kisebb mértékben és kompetitív módon gátolja. Ezekkel szemben a kataláz3 aktivitásában a szalicilsav nem okozott változást még 10 mM koncentrációban sem. A kataláz3 mitokondriális enzim, mely a kukorica kataláz izoenzimeit közül a legkevésbé érzékeny gátlószerek hatására (Horváth és mtsai., 2002). Ezen eredményeink összhangban vannak mások hasonló, rizsben végzett vizsgálataival is (Chen és mtsai., 1997).

Más fenolszármazék esetében is vizsgáltuk, hogy milyen mértékben gátolják a kataláz1 és a kataláz2 izoenzimek aktivitását. A benzoésav, az acetyl-szalicilsav és az o-hidroxi-fahéjsav a szalicilsavhoz hasonlóan jelentős mértékben gátolták a kataláz1 aktivitását, a kataláz2-t viszont csak gyengén. Egyedül a 4-hidroxi-benzoésav mutatott eltérést, mely a kataláz1 aktivitásában is csak kismértékű gátlást okozott, a kataláz2 esetében pedig nem történt szignifikáns aktivitás-csökkenés. Enzimkinetikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az acetyl-szalicilsav, a szalicilsavhoz hasonlóan, nem-kompetitív módon gátolja a kataláz1 aktivitását, míg a 4-hidroxi-benzoésav kompetitív gátlást okoz. A kataláz2 esetében megfigyelt gyenge kompetitív gátlás megfelelhet a Durner és Klessig (1996) által javasolt mechanizmusnak, mely szerint a szalicilsav jelenlétében a kataláz peroxidatív működése fokozódik. A szalicilsav mint elektrondonor szerepel, és az enzimet lassabb peroxidatív reakcióba vonja ( $\beta$ -aktivitás). A kataláz enzim  $\beta$ -aktivitásának fokozása a fenolszármazékok általános tulajdonsága. A kataláz enzim gátlása során a szalicilsav elektront ad le, és így szabadgyökké alakul. A szalicilsav-gyök lipidperoxidációt okozhat, és a keletkező lipidperoxidok részt vehetnek jelátviteli folyamatokban, például a szalicilsav-függő rezisztencia kialakulásának folyamatában (Anderson és mtsai., 1998). A kataláz1 esetében megfigyelt erőteljesebb, nem-kompetitív típusú gátlásnak más mechanizmus állhat a hátterében. Ez a típusú gátlás a szalicilsav erősebb kötődését feltételezi az enzimhez, melyet az enzim-inhibitor komplex egy nagyságrenddel kisebb disszociációs állandója is mutat. Ez a

nagyobb mértékű nem-kompetitív gátlás csak azokra a fenolszármazékokra jellemző, ahol a benzolgyűrű 4. szénatomján nincs szubsztitúciós csoport. Dohány kataláz esetében hasonló megfigyelést tettek: a 4-hidroxi-benzoészav nem volt képes olyan nagy mértékű gátlást kiváltani, mint a szalicilsav, acetyl-szalicilsav, vagy a 2,6-dihidroxi-benzoészav (Chen és mtsai., 1993b). Ez a hasonlóság a dohány kataláz és a kukorica kataláz1 között egyezik azzal a megállapítással, hogy szekvencia homológia alapján a kataláz1 közelebbi rokonságot mutat a dohány kataláz enzimével, mint a kukorica kataláz2 (Scandalios és mtsai., 2000).

A katalázgátlással párhuzamosan más enzimek, pl. GR ill. POD aktivitása, mind szalicilsav, mind több rokon vegyületének hatására megnövekedett. Jól ismert, hogy mind a glutation, mind ennek az oxidáltsági fokát meghatározó, és ezáltal az aszkorbát-glutacion cikluson keresztül a reaktív oxigénformák mennyiségének szabályozásában kulcsfontosságú enzim, a GR aktivitása meghatározó lehet az egyes növények hidegtűrésének mértékében is (Prasad, 1996; Kocsy és mtsai., 1996; Kocsy és mtsai., 1997; Noctor és Foyer, 1998). Ebből leszűrjük azt a következtetést, hogy a szalicilsav típusú vegyületek hatásmechanizmusa legalábbis részben az, hogy a csökkent katalázaktivitás hatására átmenetileg megnő a  $H_2O_2$  mennyisége, ami viszont mint ismert jelátvivő molekula, képes más védekező rendszereket aktiválni (Janda és mtsai., 1999a; Janda és mtsai., 2000a; Horváth és mtsai., 2002). Ezek a következtetések összhangban vannak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, miszerint szalicilsav hatására megnő a  $H_2O_2$  mennyisége a sejtekben (Chen és mtsai., 1993a), valamint, hogy  $H_2O_2$  adagolással bizonyos antioxidáns enzimek aktivitása megnő, és ezzel párhuzamosan fiatal kukoricánövények hidegtűrése fokozható (Prasad és mtsai., 1994b).

A későbbiek során más szerzők számos más növényfajokkal végzett kísérletekben is beszámoltak a szalicilsav ill. rokon vegyületeinek hidegkárosodást csökkentő hatásáról. Mind paradicsom, mind bab növények esetében a szalicilsav és rokon vegyülete az aszpirin egy bizonyos koncentrációtartományban (0,1-0,5 mM) nemcsak gyökéren keresztül öntözéssel, hanem permetezéssel levélen át, vagy ültetés előtt a magokat áztatva azokon keresztül képesek voltak a növények nemcsak a hideg-, hanem hő- és szárazságtűrését is fokozni (Senaratna és mtsai., 2000). Egy későbbi munkában kimutatták, hogy 0,5 mM szalicilsav alkalmazásával a kukorica mellett uborka és rizs levelében és hipokotiljában is csökkenteni lehetett a hidegkárosodás tüneteit (Kang és Saltveit, 2002). Érdekes módon radikulában a kezelés nem csökkentette a hideghatás által megemelkedett ionkiáramlást. Ez megerősíti azokat az eredményeinket, miszerint a szalicilsav és egyes rokon vegyületei a gyökérre nézve károsító hatása is van (Pál és mtsai., 2002). Abban az esetben azonban, mikor a növény a csírázástól kezdve találkozik a szalicilsavval, adaptálódhat hozzá, így bizonyos esetekben már

a gyökérben jelentkező stresszhatás elmaradhat (Kang és Saltveit, 2002). Banán növényeket 0,5 mM szalicilsavval permetezve vagy akár talajon keresztül öntözve, szintén hidegstressztoleranciáról számoltak be (Kang és mtsai., 2003a). A mi, kukoricával kapott eredményeinkkel összhangban, banán növények esetében is azt kapták, hogy normál hőmérsékleten (banán esetében ez 30/22 °C) a szalicilsav-kezelés katalázaktivitás csökkenéssel peroxidázaktivitás emelkedés jár együtt, a SOD aktivitás viszont nem változott. Mindezek mellett alacsony hőmérsékleten (5 °C) a szalicilsav-kezelt növények esetében SOD, kataláz és APX enzimek aktivitásemelkedését írtak le. Ezek az eredmények is azt erősítik, hogy a szalicilsav a hatását elsődlegesen a hidrogén-peroxid metabolizmuson keresztül fejti ki (Kang és mtsai., 2003b). Más szerzők paradicsomban kimutatták, hogy mind a metil-szalicilát, mind a metil-jazmonát 0,01 mM koncentrációban javította a termések hidegtűrését az 5°C-os tárolás során, valamint PR-fehérje expressziót váltott ki (Ding és mtsai., 2002). A 0,5 mM és 0,1 mM koncentrációjú kezelés azonban inkább rontott a hidegtűrésen. Az abiotikus stressztolerancia fokozásához szükséges szalicilsav koncentráció rendszerint függ a növényfajtól, a kezelt szövet típusától, a kezelés módjától és időtartamától. Általában az alacsonyabb koncentrációk (0,01-0,5 mM között) bizonyultak hatékonyak, míg 1 mM koncentráció felett már olyan mértékű oxidatív károsodás éri a növényt, amely után nem képes regenerálódni.

A szalicilsav és rokon vegyületeinek gyakorlati alkalmazását illetően az egyik legpraktikusabb módszernek a magok ültetés előtti áztatása tűnik (persze csak azon fajok esetében, ahol ez célszerű technológiával kivitelezhető). Szalicilsav és egyes származékai, mint pl. aszpirin, metil-szalicilsav vagy 2,6-dihidroxi-benzoésav megfelelő koncentrációban való alkalmazásával alacsony hőmérsékleten csírázásserkentő hatást írtak le sárgarépa (Rajasekaran és mtsai., 2002) és paprika (Fung és mtsai., 2004; Korkmaz, 2005) esetében is. Egyes szerzők előzetesen szalicilsavban áztatott magokból kikelt növényekben hideg, szárazság és hőtoleranciát is leírtak (Senaratna és mtsai., 2000). Vizsgálataink ehhez hasonlóan azt mutatták, hogy a szalicilsavas áztatás Cd-mal szemben is ellenállóbbá teheti a növényt, ahogy azt kukorica esetében bemutattuk (Krantev és mtsai., 2007). Ezekben a növényekben kisebb volt a kadmium indukálta membránkárosodás, ellenben megnőtt egyrészt a prolínkoncentráció, valamint egyes antioxidáns enzimek (APX, SOD) aktivitása is, aminek hatására a növény könnyebben megőrizte fotoszintetizáló képességét is (adatok nincsenek bemutatva).

Szalicilsav és bizonyos származékai, mint pl. a metil-szalicilsav hatására a hidegtűrés-fokozódás az alternatív légzési út fokozottabb működésével járt együtt. Feltételezések szerint

az alternatív légzési út, ill. az ezáltal indukált hőtermelés közvetve vagy közvetlenül szerepet játszhat a hidegtűrő kialakulásában is (Moynihan és mtsai., 1995). Ezzel összhangban van csoportunk és más kutatók munkája is, miszerint pl. a hidegtűrőbb kukoricavonalakban általában magasabb cianid-rezisztens légzésintenzitás mérhető (Vandevanter, 1985; Luxova and Gasparikova, 1999; Szalai és mtsai., 2005).

Az exogén szalicilsavval kapcsolatos vizsgálatok tükrében érdekes és fontos eredményeket hoztak azok a kísérletek, amelyek a szalicilsav-metabolizmusban módosított modellnövényeken zajlottak. Szalicilsav felhalmozásra képtelen *NahG* transzgenikus növények, melyek bakteriális (*Pseudomonas putida*) eredetű szalicilát-hidroxiláz gént hordoznak, és így képtelenek a szalicilsav felhalmozására, mivel a szalicilát-hidroxiláz enzim a szalicilsavat katekollá alakítja (Gaffney és mtsai., 1993), valamint olyan *Arabidopsis* mutánsok felhasználásával, amelyekben a szalicilsav-anyagcsere valamilyen módon érintett, azt kapták, hogy az alacsony hőmérsékleti toleranciát a túlzott mértékű szalicilsav felhalmozás csökkenti (Scott és mtsai., 2004). Saját, transzgenikus *NahG* dohánynövényekkel végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy a *NahG* gén nem befolyásolta jelentősen a hidegkárosodás mértékét, szemben pl. néhány napos hideg-előedzéssel, melynek szignifikáns hatása volt (nem közölt eredmények). Az eddigi ismereteink szerint azonban a fenti eredmények értékelésekor több szempontot is figyelembe kell venni. A *NahG* növények egyik fő korlátja, hogy a szalicilsavat katekollá alakítja, amelynek hatását sem szabad figyelmen kívül hagyni. A kísérletek értékelésekor figyelni kell arra, hogy a *NahG* növényekben a szalicilsav hiánya okozza-e a megfigyelt jelenséget, vagy a szalicilsav átalakulásakor keletkező katekol felhalmozódása. Egyes eredmények ugyanis azt mutatják, hogy a vad típusú *Arabidopsis* növényekben a katekol-kezelés önmagában is a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*-val szembeni rezisztencia elvesztését okozta, hasonlóképpen a *NahG* növényekhez (van Wees és Glazebrook, 2003). Mindemellett eddigi vizsgálataink arra is rámutattak, hogy a szalicilsav-anyagcsere több komponense, pl. egyes feltételezett prekursorok, mint a benzoésav, vagy oHCA is hasonló hatás kifejtésére képes. Az még korántsem ismert, hogy ezekben a transzgenikus ill. mutáns növényekben, akár *Arabidopsis*-ről, akár dohányról legyen szó, hogyan alakul ezen vegyületek képződése az egyes stressz körülmények között.

Amíg akár a benzoésav, akár az aszpirin, de korábbi megfigyeléseink szerint a szalicilsav is (Janda és mtsai., 1999a) alacsony hőmérsékleten védelmet nyújt a hideg károsító hatásai ellen, normál hőmérsékleten stresszt okoznak (Janda és mtsai., 2000a). Ahogy azt más szerzők árpában is megfigyelték, szalicilsav hatására csökken a nettó fotoszintetikus aktivitás, és ennek következtében a növények növekedése is lassul (Pancheva és mtsai., 1996). Fiatal



kukoricában 1 napos 22/20 °C-os szalicilsav-, benzoésav- vagy aszpirinkezelés hatására (tápoldathoz adagolva) a PS2 maximális kvantumhatásfokát jelző  $F_v/F_m$ , valamint a fotokémiai kioltás még egyáltalán nem csökken, és az aktuális kvantumhatásfok is csak kismértékben változik. Ezen adatokból arra következtethetünk, hogy a nettó fotoszintéziscsökkenés nem elsősorban a PS2 károsodásából ered, hanem inkább a gázcsere nyílások záródásának, valamint egyes, a CO<sub>2</sub> fixációban szerepet játszó enzimek, elsősorban a Rubisco aktivitáscsökkenésének (Pancheva és Popova, 1998) a következménye. Meg kell jegyezni, hogy más kísérletekben szalicilsavat vagy aszpirint levélre permetezve sztómakonduktivitás- és transpiráció-növekedéssel párhuzamosan nettó asszimiláció-emelkedésről számoltak be szójabab és kukoricában (Khan és mtsai., 2003). Pikomolnyi koncentrációban alkalmazva a szalicilsav sejtnövekedést és szomatikus embriogenezist is stimulált (Luo és mtsai., 2001; Quiroz-Figueroa és mtsai., 2001).

Az eredmények azt mutatják, hogy a szalicilsav mellett számos rokon vegyület hasonló biokémiai és élettani hatásokkal bír. Több vegyület esetében kimutattuk a hidegtűrés fokozását, valamint az egyes antioxidáns enzimek aktivitásának befolyásolását. Más szerzőkkel ellentétben (Senaratna és mtsai., 2003) azonban ezek a hatások nem általánosíthatók valamennyi fenol típusú vegyületre, hiszen kivételek is akadtak (pl. 5-szulfoszalicilsav). Hangsúlyozandó továbbá, hogy több fiziológiailag aktív vegyületről tudjuk, hogy a szalicilsav szintézisút vegyülete, vagyis az olyan vizsgálatoknál, ahol a szalicilsavszint szabályozása a cél, erre is figyelemmel kell lenni.

#### *5.1.1. A szalicilsav hatásmechanizmusa*

Az utóbbi években a szalicilsavnak az alacsony hőmérséklet elleni védelemben játszott szerepén kívül több más abiotikus stresszfaktor is a vizsgálódás tárgyát képezte. Alacsony koncentrációban alkalmazva a szalicilsav átmeneti oxidatív stresszt okoz a növénynek, és ez mint egy edzési folyamat, a növény antioxidatív kapacitását megnöveli ill. stresszvédő anyagok szintézisét indukálja. Magasabb szalicilsav koncentráció azonban olyan mértékű oxidatív stresszt okoz, mely a hiperszenzitív reakcióhoz hasonló sejtelhaláshoz vezethet. A szalicilsav kezelés és az akklimatizációs folyamat közös tulajdonsága, hogy átmenetileg megemelik a hidrogén-peroxid szintet (Okuda és mtsai., 1991; Chen és mtsai., 1993b; Luo és mtsai., 2001). Biotikus stressz esetében egyes elképzelések szerint ennek fontos szerepe van a szisztémikus szerzett rezisztencia kialakulásában és a PR fehérjék expressziójában (Chen és mtsai., 1993a), bár mások megkérdőjelezzik ezt (Neuenschwander és

mtsai., 1995). Az viszont bizonyított, hogy a megnövekedett hidrogénperoxid-szint hozzájárulhat a fiatal kukoricánövények hidegtűrésének fokozódásához (Prasad és mtsai., 1994a,b).

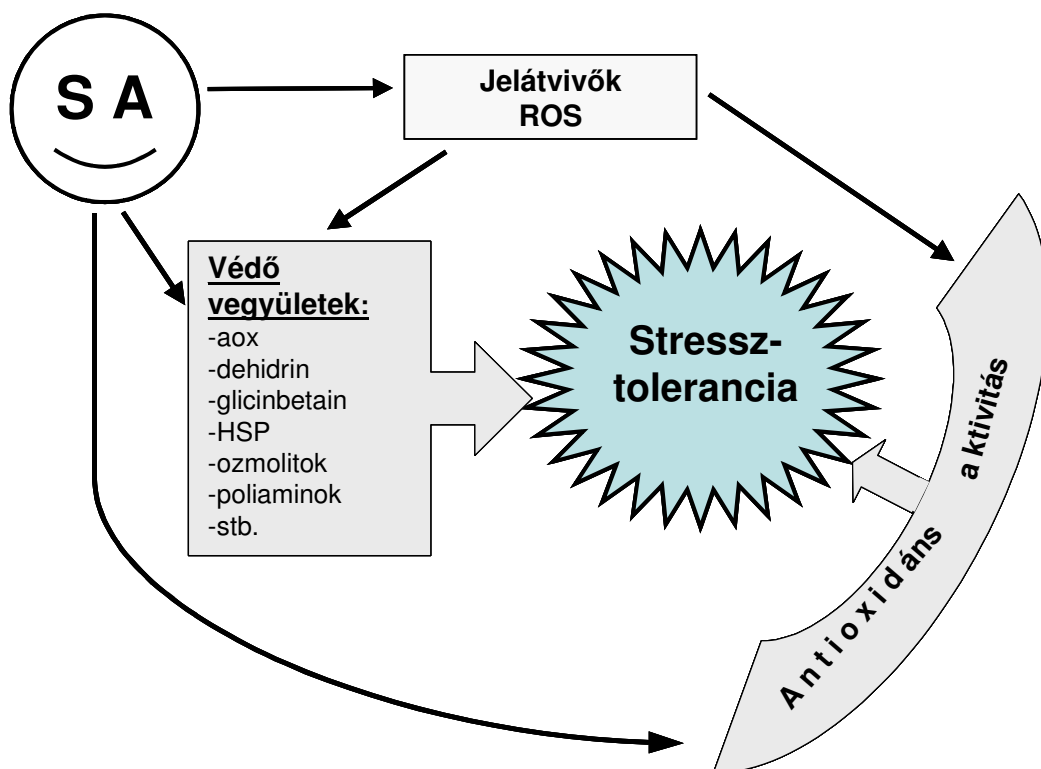
A hidrogénperoxid-szint növekedés elsősorban a szalicilsav, vagy egyes rokon vegyületeinek antioxidáns enzimekre gyakorolt hatásából ered (Janda és mtsai., 1997, 1999a, 2000a; Szalai, 1997a; Dat és mtsai., 1998a,b; Klessig és mtsai., 2000; Ganesan és Thomas 2001). Ez a hatás lehet közvetlen, mint ahogy többen, köztük kukorica esetében mi is kimutattuk (Janda és mtsai., 2007a; Horváth és mtsai., 2002), hogy a szalicilsav és társai képesek közvetlenül gátolni annak aktivitását, de történhet közvetetten is, hisz a szalicilsavról az elmúlt években kiderült, hogy olyan jelátviteli molekulaként is működik, mely számos, a stressztolerancia kialakításában fontos gén indukciójáért felelős. A legtöbb antioxidáns enzimről kimutatták, hogy a szalicilsav befolyásolja aktivitásukat, bár ez a hatás függ a növényfajtól és a kezelés módjától egyaránt. A Cu/Zn-SOD enzim aktivitását serkenti a szalicilsav, mely hozzájárulhat a hidrogén-peroxid szint emelkedéséhez (Rao és mtsai., 1997). Ugyanakkor a POD és a GR működését is fokozza a szalicilsav *in vivo*, mely viszont a hidrogén-peroxid felhalmozódás ellen hat (Dat és mtsai., 1998a, Janda és mtsai., 1999a). A GST enzim esetében nem egyértelmű a szalicilsav hatása. Az enzim *in vitro* aktivitását nem-kompetitív módon gátolja a szalicilsav (Watahiki és mtsai., 1995), míg expressziójára serkentő hatású. Egyes GST gének promóter régiójában szalicilsav-érzékeny elemet találtak, melyet a szalicilsav, illetve az auxin és a metil-jazmonát is reaktív oxigénformákon keresztül aktivál (Garretón és mtsai., 2002).

A sejtek oxidatív státuszának szabályozásán túl a szalicilsav számos egyéb folyamat működését befolyásolja. A reverzibilis proteinfoszforiláció az egyik legfontosabb stresszválasz szabályozási mechanizmus. *Brassica oleracea* és őszibarack növényekben sebzés hatására írtak le bizonyos receptor protein kinázok expressziófokozódását, melynek regulációjában a szalicilsav is részt vett (Pastuglia és mtsai., 1997; Bassett és mtsai., 2005). Stressz körülmények között a szalicilsav képes többféle protein kináz génjének fokozására, ahogy azt mind az ún. mitogén-aktiválta (MAPK), mind pedig a kalcium-függő protein kinázok (CDPK) esetében többen leírták (Jonak és mtsai., 2002; Chung és mtsai., 2004; Leclercq és mtsai., 2005).

Az előbbiektől mellett számos olyan anyag szintézisének fokozódását írták le szalicilsav hatására, melyek közvetve vagy közvetlenül hozzájárulhatnak a növények abiotikus stressztoleranciájához. Hőstressz során jelentős szerepet játszanak az ún. hősokk-proteinek (HSP). Különböző növényekben több hősokk-fehérje szalicilsavra történő indukcióját is

leírták, és ez az indukció rendszerint együtt járt a növények hőtoleranciájának emelkedésével is (Cronje és Bornman, 1999; Clarke és mtsai., 2004; Pan és mtsai., 2006). Árpa növények esetében abszcizinsav-felhalmozódásról számoltak be, melyről közismert, hogy mind alacsony hőmérsékleti, mint szárazságstressz esetén jelentős szereppel bír (Bandurska és Stroinski, 2005). Más szerzők petúnia növényekben ozmotin (Kim és mtsai., 2002) árpában glicin-betain (Jagendorf és Takabe, 2001), *Boea crassifolia*-ban dehidrin (Shen és mtsai., 2004) gének indukciójáról számoltak be, melyek szintén hozzájárulnak egyes abiotikus stresszorok ártó hatásainak kivédésében. A poliaminok szintézisének fokozódását csoportunkban mutattuk ki kukoricában (Németh és mtsai., 2002).

Összefoglalva az eddigieket a **31. ábra** mutatja a szalicilsav azon lehetséges hatásait, melyekkel hozzájárulhat az adott növény megnövekedett stressztoleranciájához. Eszerint a szalicilsav vagy közvetlenül, ahogy azt pl. a kataláz esetében láttuk, vagy közvetve, jelátvivőkön, pl. egyes reaktív oxigénformákon keresztül képes egyes antioxidáns enzimek aktivitását szabályozni. Másrészt a szalicilsav hatására több olyan vegyület szintézise fokozódhat, amelyek stresszkörülmények között bizonyítottan védő szerepet töltenek be.



**31. ábra.** A szalicilsav által szabályzott mechanizmusok, melyek szerepet játszhatnak az abiotikus stressztoleranciának kialakításában (Janda és mtsai., 2007 után). aox: alternatív oxidáz; HSP: hősokk-proteinek; ROS: reaktív oxigénfajták; SA: szalicilsav.

## 5.2. Az AG TL sáv változása mint a különböző stresszfactorok indikátora

Termolumineszcenciát fotoszintetizáló anyagból hagyományosan általában a mintának jóval fagypont alá való hűtése után mérnek (Demeter és Govindjee, 1989; Vass és Govindjee, 1996; Ducruet, 2003). Az újabb vizsgálatok azonban azt mutatják, hogy a fagyasztás bizonyos esetekben jelentős mértékben befolyásolhatja a növények TL kibocsátását (Ducruet és mtsai., 1998; Homann, 1999; Janda és mtsai., 1999b). Izolált tilakoid esetében a hatás elsősorban kvantitatív, de intakt rendszerekben a keletkezett görbe alakja teljesen más lehet (Homann, 1999).

Zöld növényeket rövid idejű (egy elektronátmenetet megengedő ún. single turnover) fényfelvillanással (*flash*) gerjesztve elvileg az  $S_2/Q_B$  töltésrekombinációból eredő B-sávot kapjuk. Ez a sáv rendkívül „fagytoleráns”, hiszen még igen alacsony ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  vagy az alatti) lehűtést követően is kimutatható. Intakt leveleket vizsgálva azonban azt kaptuk, hogy már rövid idejű, nem túl alacsony hőmérsékletű ( $-4 - -10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) fagyasztás után is jelentős amplitúdócsökkenés következik be. Ennek magyarázata lehet egyrészt, hogy a fagykárosodásra a vakuolumból olyan anyagok áramolhatnak ki, melyek a fotoszintetikus elektrontranszportot közvetlenül gátolhatják, másrészt feltehető, hogy levelekben az egy fényfelvillanással gerjesztett sáv valójában összetett, és tartalmazza, ha kisebb mértékben is, mint a távoli vörös fénnel történő indukció után, az AG-sávot is, amely fagyhatásra eltűnik. Ez magyarázhatja a *flash*-indukálta B-sávnak fagyasztásra bekövetkező látszólagos eltolódását az alacsonyabb hőmérsékletek felé.

A távoli vörös fénnel történő gerjesztés alapvetően két, de egymástól nem független módon befolyásolja a TL kibocsátást:

1. A tilakoidmembrán lumenjének savanyítása (melynek hatására felerősödnek az  $S_3 \rightarrow S_2$ , és kisebb mértékben az  $S_2 \rightarrow S_1$  átmenetek, ezáltal megnő a  $Q_B^-$   $S_3/S_2$  rekombináció valószínűsége) következtében a B-sáv alacsonyabb hőmérsékletek felé való eltolódását okozza. A fehér fénnel ellentétben a távoli vörös fény specifikusan protongradienst, ezáltal B-sáv eltolódást (alacsonyabb hőmérséklet felé) indukál anélkül, hogy a plasztokinon-pool redukálódna (Miranda és Ducruet, 1995b). Ennek a visszafordítása akár szétkapcsolószerral (Miranda és Ducruet, 1995a), akár hővel vagy faggal (Janda és mtsai., 2004) mutatja a protonok átáramlását a tilakoid membránon keresztül.

2. Megjelenik egy  $40-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os csúcshőmérséklettel jellemezhető sáv (AG-sáv), ami szintén protongradiens függő, hisz szétkapcsolószerral eltüntethető (Björn, 1971). Ennek a mechanizmusa azonban összetettebb, mint a „hagyományos” TL sávoké, hisz egy reverz

elektronáramlást az  $S_2S_3/Q_B$  centrumokhoz, illetve a ciklikus elektrontranszportlánc részvételét igényli (Sundblad, 1988). A  $Q_B$  részvételét az AG-sáv kialakításában a B és AG termolumineszcencia sávok sötétben történő lecsengési idejeinek tanulmányozásával sikerült közvetlenül igazolnunk (Ducruet és mtsai., 2005a). Azt mondhatjuk tehát, hogy az *afterglow* (AG) kisugárzás egy a kloroplasztiszok sztrómájában lévő redukáló vegyületekből a másodlagos kinon akceptor,  $Q_B$  felé irányuló reverz elektrontranszfer eredménye. 30 °C fölé történő melegítéssel ez az út ugyanúgy indukálható, akárcsak a ciklikus elektrontranszportlánc, vagy a hőindukálta State 1 - State 2 átmenet. Egyes feltételezések szerint, ahogy azt *Chlamydomonas* zöldalgában leírták, a State 2 pozíció serkenti a ciklikus elektrontranszportlánc működését, ami a PS2 fotoinhibíció elleni védelmét biztosítja (Finazzi és mtsai., 2001, 2002). Elmondható, hogy az AG-sáv tulajdonságait a redukáló erők állapota, valamint a membránok hőmérsékletfüggő változásai szintén befolyásolják. Mindezek magyarázzák a kukoricánövényekben az AG-sáv csúcshőmérsékletének ( $T_{max}$ ) magas hőmérséklet hatására bekövetkező emelkedést is (Janda és mtsai., 1999b).

Különböző hidegtűréssel rendelkező kukoricavonalak felhasználásával korábban kimutattuk, hogy az AG-sáv csúcshőmérséklete hidegtűrő növényekben általában alacsonyabb értéket mutat (Janda, 1996; Ducruet és mtsai., 1997). A későbbiekben a termolumineszcencia módszert P700-kinetika és fotoakusztikus spektroszkópia módszerekkel kiegészítve igazolni tudtuk a ciklikus elektrontranszportláncnak egyes kukoricavonalak hidegtűrésében betöltött szerepét (Ducruet és mtsai., 2005b). Ez a felismerés alkalmas tesztmódszer kidolgozása révén hozzásegíthet a jobb hidegtűrűsű vonalak kiválasztásához is.

Az AG-sáv az egyik legfagyérzékenyebb sáv, mely kizárólag intakt mintákban, azaz alga sejtekben, levelekben, protoplasztokban, ill. izolált intakt kloroplasztiszokban figyelhető meg. Nem mutatható ki azonban - szemben a klasszikus Q- és B-sávokkal - izolált tilakoidban vagy PS2 részecskékben. A fagyasztás hatását értelmezhetjük úgy is, mint egyfajta szétkapcsolóhatást, mely a tilakoidmembránok mechanikai károsítása révén megszünteti a protongradienst. Mindezt nigericinnel végzett kísérleteink is alátámasztják. Az előzetes fagyasztás hatása azonban az egyes növényfajokban kapott TL görbékre más és más lehet. Kukoricában már egy igen enyhe fagyhatás is jelentősen csökkenti az AG-sáv intenzitását. Ezzel szemben a távoli vörös fény által indukált B-sáv csupán sokkal alacsonyabb hőmérsékleten kezd el csökkenni. Azonban egy küszöbérték alatt (esetünkben -5 °C) a B-sáv intenzitása is hirtelen leesik. Ennek ellenére a vizsgált fajokban a muskátlin kívül még extrém alacsony hőmérsékleteken is kimutatható. A muskátli mellett más szerzők *Dunaliella salina* zöldalga esetében számoltak be arról, hogy olyan sejtekben, melyek sós közegben vannak,

fagyhatásra a TL jel teljesen eltűnik. Ez esetben lehetséges magyarázatként egy fagyhatásra történő erőteljes NaCl beáramlás és/vagy glicerín kiáramlás adható (Zchut és mtsai., 2003). Muskátli esetében hasonló mechanizmust tételezhetünk fel, azzal a különbséggel, hogy itt a fagyhatásra sérült vakuólumból áramolhatnak ki olyan anyagok, melyek hatására TL már nem lesz mérhető.

Alacsony hőmérsékleti (de még fagypont feletti) stressz (*chilling*) hatására a hidegérzékeny kukoricánövényekben az AG-sáv amplitúdója egy kezdeti emelkedés után erősen lecsökkent, majd megjelent a magas hőmérsékleti (ún. HTL) sáv. Kismértékű (rövid idejű) stressz, ill. akklimatizációs hőmérsékleten való nevelés hatására  $T_{max}$ -csökkenés is megfigyelhető nemcsak az AG, hanem a *flash*-sel indukált B-sáv esetében is. A B-sáv elsősorban fotoinhibíciós kezelés hatására bekövetkező eltolódását már korábban is több esetben leírták. *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalga esetében ennek hátterében egy a PS2 D1 proteinjében bekövetkező konformációváltozást tételeztek fel (Ohad és mtsai., 1988). Egy másik zöldalga, *Chlamydomonas stellata*, valamint intakt borsó levelek esetében korábban bemutattuk, hogy a jelenség hátterében a Q- és B-sávok arányának eltérő mértékű változása áll (Janda és mtsai., 1992). Figyelembe kell venni azt is, hogy bizonyos esetekben alacsony hőmérsékleti fotoinhibíció során nemcsak a PS2, hanem a PS1 is károsodik (Sonoike, 1996; Barth és Krause, 1999), ami szintén hozzájárul az AG-sáv csökkenéséhez. Meg kell jegyezni továbbá, hogy a B-sáv eltolódását a tilakoidmembrán lumenjének savasodása is okozhatja (Miranda és Ducruet, 1995b). Más szerzők a B-sáv alacsony hőmérsékletek felé történő eltolódását a  $Q_A$  és  $Q_B$  közti redoxpotenciál-különbség csökkenésével magyarázzák (Ivanov és mtsai., 2003).

Az AG-sáv amplitúdója a sejtek NADPH+ATP tartalékainak jó indikátora (Krieger és mtsai., 1998; Roman és Ducruet, 2000). Az alacsony hőmérsékleten fellépő fotoinhibíció mellett ezen tartalékok kimerülése is hozzájárulhat az AG-sáv stresszhatásra bekövetkező csökkenéséhez. Érdekes kérdés, hogy mi magyarázza viszont az enyhe stresszre bekövetkező amplitúdó-emelkedést. Ezt először rövid idejű hidegstressz hatására figyeltük meg (Janda és mtsai. 2000b), de később kis koncentrációjú kadmiumkezelés során is megfigyeltük (nem publikált eredmények). Ennek magyarázatára egy lehetséges elmélet az, hogy a stressz egy olyan alarmreakciót indukál a növényekben, mely nagy ATP+NADPH igényű növekedési folyamatokat gátolja. Ez jól megfigyelhető kismértékű stresszhatások esetében, ahol a növények fiziológiásan „tünetmentesek”, élettani paramétereik normálisak, viszont lassabban növekednek. Ez viszont jelentős ATP+NADPH megtakarítással jár, ami a túlélést jelentő védekezési és regulációs folyamatokra fordítható.

A HTL-sáv megjelenése független a minta előzetes gerjesztésétől, és korrelációt mutat a stresszhatásra keletkező lipidperoxidok mennyiségével (Venediktov és mtsai., 1989; Hideg és Vass, 1993; Vavilin és Ducruet, 1998; Vavilin és mtsai., 1998). Ahogy azt mind kukoricánövényekben, mind transzgenikus dohányokban bemutattuk, e változások mind a hidegtűrő genotípusban, mind az alacsony hőmérséklethez edzett növényekben később következnek be.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a távoli vörös fény által indukált TL sávok vizsgálata egy érzékeny, praktikus stresszdetektálási módszernek tekinthető, figyelembe véve, hogy az AG-sáv viselkedését számos élettani jellemző (a növény, ill. a levél kora, vízellátottság, előzetes megvilágítottság, stb.) jelentősen befolyásolják, amikre figyelemmel kell lenni akkor, ha különböző típusú növényeket hasonlítunk össze, viszont mivel rendkívül érzékenyen reagál a különféle stresszhatásokra, azok mechanizmusának tanulmányozására is eredményesen használható.

### ***5.3. Az antioxidáns enzimek szerepe gazdasági növények abiotikus stressztoleranciájában***

A megfelelő mértékű télállóság kialakításához még a kiváló fagyállósággal rendelkező őszi gabonafajták esetében is fontos, hogy mielőtt fagypont alatti hőmérsékletre kerülnének, bizonyos idejű alacsony, de még fagypont feletti hőmérsékleten történő edzési perióduson essenek át. Az őszi búza fagyállóságának kialakításában egyes kromoszómák, elsősorban az 5A, 7A, és 5D kitüntetett szerepet játszanak. Ezen kromoszómák fagyérzékeny tavaszi búzafajtába történő bevitele annak télállóságát jelentősen megnöveli (Sutka, 1981).

Ismert, hogy az alacsony hőmérséklet nemcsak a hidegérzékeny, hanem a hidegtűrő növényekben is megnöveli a reaktív oxigénformák mennyiségét. Búzanövények hidegkezelése során egy gyors, de átmeneti  $H_2O_2$ -szint emelkedést írtak le (Okuda és mtsai., 1991). Hidegedzett növények mind az enzimatis, mind a nem-enzimatis antioxidánsokból nagyobb mennyiséget tartalmazhatnak (Scebba és mtsai., 1999; Kocsy és mtsai., 2001b). Más szerzők gabonafélékben korrelációt találtak a fagystressz és az oxidatív stressz mértéke között (Bridger és mtsai., 1994), ami arra utal, hogy az a képesség, amivel közömbösíteni tudják a káros reaktív oxigénformákat, hatással lehet a gabonafélék fagyállóságának mértékére is. Vizsgálatainkban az első erre vonatkozó kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy milyen kapcsolat van a gabonafélék fagyállósága és egyes antioxidáns enzimek aktivitása között. Az antioxidáns aktivitást tekintve általánosságban elmondható, hogy a

legfagyállóbb vizsgált genotípus, a Motto rozs fajta a GST kivételével, mely viszonylag alacsony értéket adott, gyakorlatilag minden vizsgált enzim vonatkozásában a legnagyobb aktivitást mutatta. Későbbi vizsgálataink más rozs fajtákkal hasonló eredményt hozott. Ennek ellenére az egyes antioxidáns enzimek közül csak a levélből kivont APX és POD enzimek aktivitása mutatott szoros korrelációt a fagyállósággal, és ezek is csak a hidegedzett növények esetében. Az edzett és edzetlen növényeket összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a vizsgált enzimek közül edzés hatására jelentős növekedést a bokrosodási csomó esetében a GST, a levélben szintén a GST, valamint a POD és APX mutatott. A levél kataláz aktivitása a legtöbb esetben az edzett növényekben kisebb volt, mint az edzetleneké. Ennek magyarázatára elvileg többféle teória adódott. Korábban edzetlen őszi rosnövények esetében beszámoltak arról, hogy a kataláz enzim bizonyos körülmények között, elsősorban alacsony hőmérsékleten fotooxidatív károsodást szenvedhet (Streb és mtsai., 1999). Ahogy azt mi is bemutattuk, a katalázaktivitás csökkenésében szerepet játszhat a szalicilsav, vagy valamely rokon vegyülete is. Más szerzők közel izogén búzavonalakban, melyek az 5A kromoszóma őszi/tavaszi jelleget meghatározó *Vrn1/Fr1* régiójában különböznek, eredményeinkhez hasonlóan kimutatták, hogy az akklimatizáció során több antioxidáns enzim aktivitása fokozódik, a kataláz aktivitásában viszont csökkenést tapasztaltak. Megállapították, hogy a *Vrn1/Fr1* régió befolyásolja bizonyos antioxidáns enzimek aktivitását, mert szignifikánsan nagyobb aktivitást mutattak az őszi allélt hordozó vonalak (Baek és Skinner, 2003).

A fitotroni körülmények között kapott vizsgálataink eredményei szerint a különböző antioxidáns enzimek edzés során bekövetkező változásai azt mutatják, hogy az egyes fajok eltérő stratégiát dolgoztak ki az alacsony hőmérsékletre adott válaszhoz (Janda és mtsai., 2003). A későbbi vizsgálatokban mindezt újabb, több genotípus bevonásával végzett kísérletekkel is megerősítettük (Veisz és mtsai., 2004). Az év különböző időpontjain belül végzett összehasonlításokból is az látszik, hogy az egyes enzimek aktivitásának mértékét elsősorban faji sajátosságok határozzák meg. A rozs és a tritikálé pl. a legtöbb időpontban ill. enzim esetében kimagasló értéket mutatott. Az árpa viszonylag alacsony GR és GST, viszont kimagasló POD aktivitással bír. A zabfajták mindegyikére az alacsony peroxidáz és magas GST értékek jellemzőek. Mindezeket megerősítik a korábbi, fitotroni és szántóföldi vizsgálati adatokból származó eredményeink is (Szalai és mtsai., 1999).

Az előzőekhez kapcsolódóan kiegészítő kísérletként kukorica hibridek és beltenyészett vonalaik hidegtűrését, valamint antioxidáns kapacitását vizsgáltuk. Ehhez kilenc beltenyészett vonalat, és az ezekből létrehozott hibridet és neveltünk majd hidegkezeltük fitotroni körülmények között. Más szerzők (Holá és mtsai., 2007) adataival is összhangban



megállapíthatjuk, hogy egyrészt a hibrdek hidegtűrése rendszerint meghaladja a szülőké, másrészt a hibrdek hidegtűrése rendszerint kiegyenlítettebb, mint a beltenyésztett vonalaké. A kukorica esetében is igazolható, hogy bizonyos antioxidáns enzimek aktivitása már enyhe hideghatásra megnövekszik, ami feltehetően egy edződési periódus része. Drasztikus stresszhatásra azonban már aktivitáscsökkenés tapasztalható. Mindez nem más, mint a Selye-féle általános adaptációs szindróma megnyilvánulása növényekben: a stresszor megjelenését (esetünkben az alacsony hőmérséklet) követően edződés indul be, melynek jele az antioxidáns aktivitás növekedése is. Ha viszont tartós a drasztikus hideg, a szervezet kimerül, az aktivitás különösen az érzékeny genotípusokban csökken. Erős stresszhatásra bekövetkező antioxidáns csökkenést nemcsak kukorica hidegkezelése során, hanem sóstressznek kitett paradicsomok esetében is megfigyeltünk. Míg a sóstressz rendszerint antioxidáns indukciót vált ki (Mittova és mtsai., 2000, 2002a,b), addig tartós sóhatásnak kitett növények esetében reverz-transzkripció PCR reakcióval a *LeAPx1* gén indukciójának csökkenését lehetett igazolni (nem publikált eredmények).

Természetesen az egyes antioxidáns enzimek aktivitásadatainak elemzésekor figyelemmel kell lenni arra is, hogy ezek egy komplex szabályzó rendszer részei, aktivitásuk célja nem egyszerűen a reaktív oxigénformák minél hatékonyabb eltávolítása, hanem a redox homeosztázis fenntartásával a szervezet általános védekezőfolyamatainak szabályozásához szükséges jelátviteli rendszerhez való kapcsolódás is. Mindemellett azzal is számolni kell, hogy adott hatás ugyanazon enzim különböző izoenzimeire eltérő módon és mértékben, esetenként eltérő előjellel hathat. Ha a kukoricanövények hidegtűrési és antioxidáns adatait egybevetjük, azt mondhatjuk, hogy a két paraméter közvetlenül nincs összefüggésben egymással: az antioxidáns értékekből kukoricavonalak, illetve hibrdek hidegtűréseire nem lehet biztonsággal következtetni. Ebből következik, hogy bár a magas antioxidáns aktivitás feltehetőleg hozzájárul az alacsony hőmérsékleti toleranciához, legalábbis az alacsony hőmérsékleti stresszt kísérő oxidatív károsodás jobb elviseléséhez, de önmagában nem elégséges a kellő mértékű hidegtoleranciához. Emiatt egy adott antioxidáns enzim aktivitását mint hidegtűrési markert a gyakorlat számára nem javasoljuk (Janda és mtsai., 2005a).

Az irodalmi adatok és saját vizsgálataink alapján elmondhatjuk tehát, hogy hidegedződés során több antioxidáns enzim aktivitása fokozódik. Azonban nagy különbségek fordulnak elő nem csak fajok, hanem fajták között is abból a szempontból, hogy mely enzimek aktiválódnak. A POD és az APX enzimekről elmondható, hogy szinte minden tanulmány aktivitásuk fokozódásáról számol be. A GR, és különösen a kataláz aktivitásáról már ellentmondásosak az eredmények. Az antioxidáns enzimek egy komplex rendszert

képeznek, mely finoman szabályozott, és már a sejtek redoxállapotában bekövetkező kis különbségekre is igen eltérő választ adhat. Az eddigi adatok alapján nehéz különbséget tenni azonban a között is, hogy mely reakció képezi részét a fagyponthoz alatti hőmérséklethez való edződés folyamatának, és minek van szerepe az edzés során meglévő alacsony hőmérséklethez, illetve az esetlegesen fellépő vízhiányhoz való alkalmazkodásban.

Számos irodalmi adat és az előzőekben bemutatott eredmények is azt mutatják, hogy az APX a növényekben kulcsszerepet játszik a különböző típusú stressz körülmények között felgyülemlett reaktív oxigénformák közömbösítésében (Asada, 1992; Mittova és mtsai., 2000; Shigeoka és mtsai., 2002). Emiatt a munkánk során megkülönböztetett szerepet kapott az APX-ok molekuláris genetikai jellemzése is. Mindehhez két paradicsomfajt, a termesztett *Lycopersicon esculentum*-ot, valamint egy vad fajt, a *Lycopersicon pennellii*-t használtuk fel. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a vad faj a termesztett fajhoz képest jelentősen jobb sótűréssel rendelkezik, és ehhez egy megnövekedett antioxidáns aktivitás is hozzájárul (Mittova és mtsai., 2002a,b; 2004). Első megközelítésben egy citoszolikus típusú APX (*LeApx1*) közölt (Gadea és mtsai., 1999) szekvenciájának ismeretében mindkét fajból izoláltuk és klónoztuk a *LeApx1* gént. Vizsgálataink azt mutatták, hogy míg a kódoló régiók a két fajban nagyfokú homológiát mutatnak, addig az intron régiók közt ez a homológia lényegesen kisebb. A legnagyobb mérvű különbséget a II. intronban talált 244 bp méretű delécia jelentette. Ez az ismeret lehetőséget adott arra, hogy a különböző introgressziós vonalak (Eshed és Zamir, 1994, 1995) felhasználásával a deléciót hordozó génszakaszt mint fajspecifikus próbát felhasználva a *LeApx1* gént térképezzük. Kimutattuk, hogy ez a *LeApx1* gén a paradicsom 6-os kromoszómájának disztális végén helyezkedik el. Az előbbivel analóg módon a többi paradicsom *Apx* gén esetében is több kisebb-nagyobb különbség, mint pl. több restrikciós enzim felismerőhelybeli, valamint számos egynukleotidos eltérés mellett nagyméretű deléciók voltak kimutathatók. Ezek felhasználásával a későbbiekben lehetővé vált mind a hét paradicsomban ismert *Apx* gén (*LeApx1-7*) térképezése is (**12. táblázat**; Najami és mtsai., 2003, 2007).

**12. táblázat.** Apx gének elhelyezkedése paradicsomban (A szegmensek elhelyezkedését ld.: Eshed és Zamir, 1994; ill. az Anyagok és módszerek fejezet).

Gén	Kromoszóma	Kromoszómaszegmens
<i>LeApx1</i>	6	6-1
<i>LeApx2</i>	6	6-1
<i>LeApx3</i>	9	9-1, 9-1-2, 9-1-3
<i>LeApx4</i>	1	1-4, 1-4-1
<i>LeApx5</i>	2	2-4, 2-5
<i>LeApx6</i>	11	11-2, 11-3
<i>LeApx7</i>	6	6-2, 6-3

#### 5.3.1. A fény szerepe gabonafélék fagyállóságának kialakításában

Régóta ismert, hogy a gabonafélék fagyállóságát nemcsak a genetikai háttér, hanem a környezeti tényezők is befolyásolják. Az egyik legfontosabb környezeti tényező a fény: ismert, hogy alacsony megvilágítás mellett az alacsony hőmérsékleti edzés kevésbé hatékony (Veisz, 1989; Gray és mtsai., 1997). Őszi rozsban azt is kimutatták, hogy fagyállóságot nemcsak alacsony hőmérsékleti edzéssel, hanem magas megvilágítás melletti növényneveléssel is ki lehet alakítani, valamint hogy az alacsony hőmérséklet indukálta fotoinhibíció valamint egyes hideg-indukált gének indukciója korrelációban van a PS2-re jutó gerjesztési nyomással (Gray és mtsai., 1997). Kísérleteinkben kimutattuk, hogy egyrészt a rozshoz hasonlóan az Mv Emese őszi búza fagyállóságát tekintve alacsony fényintenzitás mellett az alacsony hőmérsékleti edzés hatékonysága jelentősen gyengébb, másrészt, hogy a fagyállóság fokozható nemcsak alacsony hőmérsékleti edzéssel, hanem normál hőmérsékleten de viszonylag magas fényintenzitáson történő neveléssel is (Apostol és mtsai., 2006; Janda és mtsai., 2007b). Az azonban még korántsem ismert, hogy a fény milyen folyamatokon keresztül képes a fagyállóság növeléséhez hozzájárulni. További vizsgálataink során a fény szerepét tanulmányoztuk néhány olyan élettani paraméter változásában, melyek összefüggésbe hozhatók a búza fagyállóságának kialakulásával. A gabonafélék, és ezen belül az őszi búzafajták fagyállósága nemcsak a tél túlélését jelenti, hanem a hidegperiódus alatt lehetőség szerint növekszik, és fejlődik is. Ha nem így lenne, nem lenne érdemes őszi

gabonaféléket termeszteni, hisz nem érné meg a fagykár hatásainak kockázatát vállalni, ha az őszi gabonafélék nem várnák kedvezőbb körülmények közt a tavasz beköszöntét. Mindezekhez a folyamatokhoz a fotoszintetikus apparátus biztosítja a megfelelő mennyiségű energiát és szénforrást, aminek megfelelő működése nélkül maximális fagyállóság nem érhető el (Huner és mtsai., 1998). Mit jelent mindez? A fotoszintetikus apparátusnak biztosítania kell, hogy a rendszerben a fény által kiváltott gerjesztési nyomás és a gerjesztési energia felhasználása egyensúlyban legyen. Az alacsony hőmérséklet csökkenti a fotoszintetikus elektrontranszportláncához kapcsolódó elektronfelhasználó folyamatok sebességét, így az egyensúly felborulhat. Ennek kivédésére a növények több stratégiát dolgoztak ki, melyek mértéke az egyes növényfajokban eltér. Az északi feltekén élő örökzöld növények növekedése és fejlődése elsősorban a meleg tavaszi és nyári időszakra korlátozódik. Ezek a növények alacsony hőmérsékleten elsősorban a xantofill-ciklushoz kötődő nem-fotokémia kioltás segítségével csökkentik a PS2 abszorpciós keresztmetszetét, aminek következtében csökken a gerjesztési nyomás. Egyes fajoknál mindez az epidermális sejtek fokozott antocián-szintézisével egészülhet ki, mely leárnyékolja az alatta lévő sejteket. A fenyőfélékhez hasonlóan az egysejtű zöldalgák zömének alacsony hőmérséklethez történő adaptációja szintén a fotoszintetikus kapacitás csökkentését eredményezi, mely, szemben az örökzöldekkel, a xantofill-ciklus fokozódása mellett klorofilltartalom csökkenéssel is együtt jár. Több más fajjal egyetemben, mint pl. az *Arabidopsis*, a gabonafélék a megnövekedett gerjesztési nyomás kivédésére azonban nemcsak az abszorpciós keresztmetszet csökkentésével, hanem a szénanyagcseréjük megfelelő módon történő átprogramozása révén a gerjesztési energia felhasználásának fokozásával is képesek reagálni (Huner és mtsai., 1998).

Ismert, hogy a PS1 körüli ciklikus elektrontranszport szerepet játszik egyrészt a PS2 kvantumhatásfokának szabályozásában, másrészt extra energiát biztosíthat a széndioxid-fixálásban résztvevő folyamatokhoz (Cornic és mtsai., 2000). A klorofill-a fluoreszcencia indukció kiváló lehetőséget biztosít az alacsony hőmérsékletnek a fotoszintetikus elektrontranszportlánc működésére gyakorolt hatásainak a vizsgálatához (Janda, 1994a,b; 1998). A PS2 maximális kvantumhatásfokát jelző  $F_v/F_m$  paraméter búzában a kísérletben használt 5-20 °C-os tartományban jelentős hőmérsékletfüggést nem mutat (Janda és mtsai., 1994b; 2004), így nem meglepő, hogy ez a paraméter néhány napos sötétben történő alacsony hőmérsékleti edzés után nem változott szignifikánsan. Ezzel szemben, jelentős fény- és hőmérsékletfüggésük miatt (Janda és mtsai., 1994a,b), mind a PS2 aktuális kvantumhatásfoka, mind a fotokémiai kioltás értéke sötét hidegedzés során eltért mind a kontroll, edzetlen növényekétől, mind a fényen edzettekétől is: fényben hidegben az érték csökkent, míg 5 °C-

os, alacsony megvilágítás melletti edzés során ezen paraméterek értéke magasabb volt, mint a kontroll, edzetlen növényekben kapott értékek. Ebből következik, hogy a PS2-re jutó gerjesztési nyomás (amit az  $1-q_p$  paraméter jelez) fényen történő edzés hatására a legmagasabb. Általánosan elfogadott tény, hogy a gabonafélék hidegedzésük során arra törekszenek, hogy minél nagyobb mértékben tudják a PS2-t oxidált állapotban tartani (Huner és mtsai., 1993; Janda és mtsai., 1994b). Mindezek mellett az alacsony hőmérsékleten fellépő fotoinhibícióval szembeni védekezés egyik módja a termikus deaktiváció mértékének növelése, ami a  $q_N$  paraméter növekedésében nyilvánul meg. Ez a növekedés kimutatható alacsony hőmérsékleti edzés során az általunk alkalmazott körülmények között is, de mértéke a várakozásoknak megfelelően normál megvilágítás mellett nagyobb volt, mint alacsony fényintenzitás mellett.

A termolumineszcencia technika utóbbi években végbement fejlődésének köszönhetően egyre nagyobb tért hódít a stresszélettani vizsgálatok között (Ducruet, 2003), beleértve az alacsony hőmérséklet hatásainak vizsgálatát is (Janda és mtsai., 1999b, 2000b, 2004, 2006). Nemrégiben fenyőben mutatták ki, hogy alacsony hőmérsékleti edzés hatására a 2 *flash*-sel indukált B-sáv amplitúdója lecsökken, mialatt a csúcshőmérséklete ( $T_{max}$  értéke) az alacsonyabb hőmérséklet irányába tolódik. Mindebből arra következtettek, hogy edzés hatására az elsődleges és másodlagos kinon akceptorok ( $Q_A$  és  $Q_B$ ) közötti redox potenciál részükül (Sveshnikov és mtsai., 2006). Ahogy már bemutattuk, hasonló B-sáv eltolódást mi is megfigyeltünk kukoricában alacsony hőmérsékleti stressz esetén (Janda és mtsai., 2000). Ilyen eltolódás nemcsak alacsony hőmérsékleten, hanem mind zöldségekben, mind magasabbrendű növényekben normál hőmérsékleten történő fotoinhibíciós kezelés hatására is leírtak már, aminek magyarázata lehet egyrészt egy a PS2 D1 proteinjében bekövetkező konformációváltozás (Ohad és mtsai., 1988), másrészt eredhet a Q- és B-sávok eltérő mértékű csökkenésének az eredőjéből is (Janda és mtsai., 1992). A tilakoidmembránok lumenjében bekövetkező pH csökkenés szintén B-sáv eltolódáshoz vezethet (Miranda és Ducruet, 1995a,b).

A megnövekedett ATP igény miatt, ami stresszkörülmények közt fellép, gyakran megfigyelhető a ciklikus elektrontranszportlánc fokozott működése is (Manuel és mtsai., 1999). A ciklikus elektrontranszportlánc következtében fokozott mértékű protonáramlás történik a tilakoidmembrán lumenjébe, ami szintén hozzájárul a nem-fotokémiai kioltáshoz. TL és P700 kinetika mérésekkel bemutattuk, hogy alacsony hőmérsékleti edzés hatására a PS1 körüli ciklikus elektrontranszport működése fokozódik, de csak abban az esetben, ha az edzés fényen történik (Apostol és mtsai., 2006). Ilyenkor egy kb. 5 °C-os eltolódás volt

megfigyelhető az alacsonyabb hőmérsékletek felé a távoli vörös fénnel indukált AG-sáv csúcshőmérsékletében, valamint a P700 re-redukciója is gyorsabb volt (Apostol és mtsai., 2006), ami szintén a ciklikus elektrontranszport fokozottabb működésére utalhat (Schreiber és mtsai., 1988). Ezek a megfigyeléseink összhangban vannak a kukorica hidegtűrésével és a ciklikus elektrontranszportlánccal kapcsolatos eredményeinkkel is (Ducruet és mtsai., 2005b), valamint más csoport uborkanövényeken kapott vizsgálataival is (Bukhov és mtsai., 2004). Mindezek megerősítik azt a feltételezésünket, hogy az alacsony hőmérsékleti edzés során fokozódott ciklikus elektrontranszport is hozzájárulhat a búzanövények megnövekedett fagyállóságának kialakulásához.

A fagyállóság azonban egy rendkívül összetett tulajdonság, így természetesen mindezek mellett számos más folyamat hatásával számolni kell. Jól ismert, hogy a lipidösszetétel kulcsfontosságú szerepet tölt be a stresszadaptációban, különös tekintettel az alacsony hőmérsékleti stresszek vonatkozásában (Nishida és Murata, 1996). Munkánkban a fénynek a fagyállóságnak a lipidösszetétel változásán keresztül történő kialakulásában betöltött szerepét tanulmányoztuk búzában. A levélben lévő MGDG valamint DGDG lipidosztályok zsírsavösszetétele nagymértékű telítetlenségüknél fogva általában nem változik edzés hatására (Huner és mtsai., 1989). Ezzel szemben, hasonlóan ahhoz, amit különböző fagyállóságú búzafajták bokrosodási csomójában korábban tapasztaltunk (Szalai és mtsai., 2001), a levél PE frakciójának 16:0 és 18:0 tartalma jelentősen lecsökkent, és ezzel párhuzamosan megnőtt a telítetlen 18:3 zsírsavak aránya. Ez a változás azonban csak abban az esetben következett be, amikor az edzés alacsony hőmérsékleten (kísérletünkben 12 nap 5 °C) és kellő megvilágítás mellett zajlott.

Az alacsony hőmérsékleti edzés egyik legmarkánsabb hatása a gabonafélék PG lipidfrakciójában figyelhető meg. Ez a lipidosztály, amely a transz16:1 zsírsavat is tartalmazza, szerepet játszik a fénygyűjtő komplex (LHC) oligomerizációjában (McCourt és mtsai., 1985; Krupa és mtsai., 1987), valamint a PS2 dimerizációjában is (Kruse és mtsai., 2000). Korábbi vizsgálatok során korrelációt mutattak ki különböző gabonafajok fagyállósága, valamint a PG frakció transz16:1 zsírsavmennyiségének az alacsony hőmérsékleti edzés során bekövetkező csökkenése között. Ezeket az eredményeket nemcsak különböző gabonafajokkal – melyek fagyállósága meglehetősen jól elkülöníthető – hanem kromoszóma-szubstitúciós vonalak felhasználásával is meg lehetett erősíteni, tehát ez a paraméter jól használható a gabonafélék fagyállóságának becslésére is (Szalai és mtsai., 2001). Jelen dolgozatban bemutatott vizsgálataink szerint a PG transz16:1 zsírsavmennyiségének csökkenése jól korrelált az adott genotípus különböző módon elért

fagyállóságával is: a fent leírt transz16:1/16:0 arány csökkenése bár kimutatható volt alacsony hőmérsékleten alacsony megvilágítás mellett, valamint normál hőmérsékleten, de emelt fényintenzitáson végrehajtott edzés mellett is, de legnagyobb mértékben alacsony hőmérsékleten megfelelő mértékű megvilágítás mellett következett be.

Ahogy azt már korábban bemutattam, a fagyállóság mértéke gabonafélék esetében is kapcsolatban áll azok oxidatív állapotával. A következő kísérletsorozat egyik célja annak felderítése, hogy ennek a kapcsolatnak a mértékéről is közelebbi felvilágosítást nyerjünk. Mint arra korábban rámutattunk, a gabonafélék fagyállósága jó korrelációt mutatott bizonyos antioxidáns enzimek, főként a POD és APX aktivitásával (Janda és mtsai., 2003). Kimutattuk, hogy 5 °C-os hidegkezelés hatására több antioxidáns enzim változása függött az edzés során alkalmazott fény erősségétől is. GR és APX enzimek aktivitása akkor mutatott legnagyobb mértékű emelkedést, amikor az edzés alacsony hőmérsékleten és normál megvilágítás mellett zajlott. De magas fényintenzitás önmagában is képes volt bizonyos enzimek aktivitását megnövelni. A SOD aktivitás nem változott szignifikánsan az alkalmazott edzőkörülmények között, de irodalmi adatok szerint ez az enzim nem áll szoros kapcsolatban a fagyállóság mértékével sem (McKersie és mtsai., 1999). Alacsony hőmérsékleti edzés szintén megnövelheti a POD enzimek aktivitását (Janda és mtsai., 2003), azonban szemben a többi vizsgált antioxidáns enzim fényfüggésével, ez az emelkedés akkor volt a legnagyobb mértékű, amikor az edzés alacsony fényintenzitás mellett történt. Mivel erről az enzimről kimutatták, hogy aktivitásának mértéke korrelál például a hópenész-rezisztencia mértékével is (Gaudet és mtsai., 2003), feltételezhetjük, hogy ennek inkább a biotikus stresszorok elleni védekezésben van szerepe. Ezt erősítette meg az a vizsgálatsorozatunk is, melyben kimutattuk, hogy a POD aktivitás egy másik abiotikus stresszfaktor, a PEG-gel indukált szárazság esetében még igen drasztikus mértékű stressz hatására is alig változott, addig biotikus támadásnál (DTR fertőzés) aktivitása jelentősen megnőtt. Fontos azonban azt is megjegyezni, hogy bizonyos antioxidáns enzimek aktivitása jelentős mértékben függ a vizsgált növényi rész korától is, ezért az egyes minták összehasonlításánál erre is tekintettel kell lenni. Mindezek mellett azt is szem előtt kell tartani, hogy az antioxidáns rendszer szabályozása igen komplex módon történik, hisz ahogy ezt a hidrogén-peroxid esetében is már ismert, a reaktív oxigénformáknak jelátvivő szerepük is van, tehát szintjüket inkább adott határokon belül kell tartani, és nem feltétlenül az azonnali teljes megsemmisítésük az, ami a leghatékonyabb védekezést biztosítja az egyes stresszfaktorokkal szemben.

Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a fagyállóság kialakításában legalább két különböző szignáltranszdukciós út, egy fényfüggő, és egy fénytől független, hidegfüggő út

vesz részt. Ezek receptorai feltehetőleg eltérnek, de működésük nem független egymástól, a jelátvitel során közös pályára kerülhetnek, közös mechanizmusokat indukálhatnak, és egymás hatásait is felerősíthetik. A fényfüggő út feltehetően a fotoszintetikus elektrontranszportlánc egyes komponenseinek oxidáltsági fokával kapcsolatos. A fény természetesen a fitokróm rendszeren keresztül is számos élettani folyamatra hatással van (Chory, 1997), de az általunk alkalmazott megvilágítási körülmények közt a fagyállóság mértékének változását sem a megvilágítás eltérő hosszával, sem annak különböző spektrális összetételével nem magyarázhatjuk. A fénytől független receptorok ismereteink szerint membránfluiditásváltozáshoz, a citoszkéletális rendszer átszerveződéséhez, vagy egyes makromolekulák konformációjának változásához köthetők, melyek hatására többek közt kalciumcsatornák működésének változása további szignáltranszdukciós utak beindítását eredményezheti. (Knight és Knight, 2001).

Egy következő általunk vizsgált jelátvivő rendszer, ami szintén kapcsolódik a reaktív oxigénformák mennyiségének szabályozásához, a szalicilsavval kapcsolatos (ehhez kapcsolódóan ld. **31. ábra**). Ahogy azt előzőleg bemutattam, megfelelő koncentrációban alkalmazva a szalicilsav átmeneti oxidatív stresszt hozhat létre, amely viszont az antioxidáns aktivitás fokozódásához (Dat és mtsai., 1998; Janda és mtsai., 1999a, 2000a), vagy különböző védőanyagok, mint pl. a poliaminok fokozott szintéziséhez vezet (Németh és mtsai., 2002). Nemrégiben kimutatták, hogy szalicilsavval permetezett búzanövények fagyállósága megnőtt, és mindez kapcsolatba hozható a megnövekedett antioxidáns aktivitással is (Tasgín és mtsai., 2003, 2006). Ismert az is, hogy nemcsak a külső szalicilsav képes a reaktív oxigénformák mennyiségét növelni, hanem azok is képesek szalicilsav szintézist indukálni (León és mtsai., 1995; Enyedi és mtsai., 1999; Pál és mtsai., 2005). Újabb eredmények azt mutatják, hogy csírázó búzanövényekben a szalicilsav indukálta  $H_2O_2$  felhalmozódás nem a kataláz vagy APX gátlásával függ össze, hanem abszcizinsavon, és kalciumon keresztüli jelátvivő rendszeren át történik, ami viszont egyes antioxidáns enzimekkel közös transzkripciósfaktorok aktiválásához vezethet (Agarwal és mtsai., 2005b). A mi vizsgálati rendszerünkben a különböző hőmérsékleten és megvilágítási viszonyok mellett hidegedzés során az endogén szalicilsav szint változása összhangban volt az APX és GR enzimek változásával. *Arabidopsis* mutánsok felhasználásával nemrégiben kimutatták, hogy a megfelelő mértékű fényakklimatizáció feltétele egy megfelelő szintű szalicilsav szint is (Mateo és mtsai., 2006).

Ismert, hogy nemcsak a szalicilsav, hanem számos rokon vegyületnek hasonló biológiai hatása van, így például több prekursorról, vagy mesterséges származékról kimutattuk, hogy az antioxidáns aktivitás fokozása révén képes volt kukorica hidegtűrését



fokozni (Janda és mtsai., 2000a; Horváth és mtsai., 2002). Búzanövények fényben történő hidegedzése során nagymértékű oHCA felhalmozódás volt megfigyelhető. Tekintettel arra, hogy a hidroxifahéjsavnak jelentős szinglet oxigén-kötő képességét írták le (Foley és mtsai., 1999), feltételezhető, hogy ez a vegyület is nemcsak mint a szalicilsav prekursora, hanem mint önálló antioxidáns vegyület is szintetizálódik.

Mindezek az eredmények megerősítik azt a feltételezésünket, hogy a szalicilsavfüggő jelátviteli út szerepének tanulmányozásakor nemcsak magára a szalicilsavra, hanem egyes prekursorainak a változásaira is figyelemmel kell lenni.

#### ***5.4. Az eredmények gyakorlati alkalmazásának lehetőségei***

A vizsgálataink fő célja néhány kiemelkedően fontos gazdasági növény különböző típusú stresszhatásokra bekövetkező válaszreakcióinak jobb megismerése volt. Ezekből az eredményekből többek között azt várjuk, hogy lehetőséget biztosítanak arra, hogy célirányosabban lehessen kiválasztani azokat a folyamatokat, amelyek akár hagyományos növénynemesítési eljárással, akár biotechnológiai úton történő befolyásolásával a növények stressztűrő képessége hatékonyabban növelhető.

A kísérletek során több esetben (pl. termolumineszcencia alkalmazása különböző növényfajok esetében, vagy egyes antioxidáns enzimek vizsgálata során) sikerült összefüggést találni az egyes vizsgálat paraméter változása ill. az adott növény stressztűrő képessége között. Ezek a felismerések alkalmasak lehetnek a gyakorlat számára megfelelő teszt módszerként való felhasználásra is.

Mindezek mellett a szalicilsavval és rokon vegyületeivel kapcsolatos eredményeink biztató alapot biztosítanak az adott vegyületek mint stresszvédő anyagok nagyléptékű, gazdaságos felhasználásának kidolgozásához.

## 6. Összefoglalás

Ritkán múlik el olyan év hazánkban, hogy a rendkívül szélsőséges éghajlatból eredően ne kelljen valamilyen súlyos gazdasági következményekkel járó káros környezeti tényezővel számolni. Az emberiség ősi vágya, hogy olyan növényeket termesszen, melyek a lehető legkisebb energiáráfordítással a lehető legtöbb hasznos terméket hozzák létre. A növénynemesítőknek és a termesztőknek egyaránt az az érdekük, hogy olyan növényekkel dolgozhassanak, melyek a környezet változásait a lehető legkisebb mértékű károsodás mellett tolerálják. Ahhoz, hogy ilyen növényeket elő lehessen állítani, mindenekelőtt a növények egyes védekező és szabályozási folyamatait kell megismerni.

Mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagy jelentősége van azon anyagok vizsgálatának, melyek a gazdasági növények stresszérzékenységét csökkenteni képesek. A dolgozatban leírt munka egyik fő célja egyes, a szalicilsavval rokon vegyületek stresszélettani szerepének felderítése volt. Ezáltal közelebb juthatunk a szalicilsavhoz kötődő szabályozási mechanizmusok jobb megismeréséhez. A munka további fontos célja egyrészt annak kiderítése volt, hogy milyen kapcsolat van egyes gabonafélék fagyállósága és antioxidáns aktivitása között, másrészt arra a kérdésre kerestünk választ, hogy milyen folyamatok vesznek részt a fagyállóság kialakulásának szabályozásában.

### ***6.1. Szalicilsavszármazékok stressztűrést fokozó hatásainak vizsgálata***

Korábban fluoreszcencia indukciós és ionkiáramlás mérésekkel kimutattuk, hogy fiatal kukoricanövények tápoldatához adott szalicilsavval azok hidegtűrését fokozni lehetett (Janda és mtsai., 1999a). Ezek után arra kerestünk választ, hogy ez a hatás mennyire általános a rokon szerkezetű vegyületek között. Az eredmények azt mutatják, hogy a szalicilsav mellett számos rokon vegyület (mint pl. az aszpirin néven jól ismert származék, az acetil-szalicilsav, vagy egyes lehetséges prekursorok, a benzoésav és az o-hidroxifahéjsav) hasonló biokémiai és élettani hatásokkal bír. Ezen vegyületek esetében szintén kimutattuk a hidegtűrés fokozását, valamint az egyes antioxidáns enzimek aktivitásának befolyásolását. Ezzel szemben más rokon vegyületek, mint pl. az 5-szulfó-szalicilsav, vagy a p-hidroxibenzoésav hatástalannak bizonyultak. Rendre bebizonyosodott, hogy az olyan vegyületek, melyek a kukorica esetében a szalicilsavhoz hasonló védelmet nyújtottak az alacsony hőmérsékleti stresszel szemben, csökkentik a katalázaktivitást. Eredményeink igazolták továbbá, hogy a kukorica kataláz izoenzimeit szalicilsav, valamint rokon vegyületeinek hatására különböző

módon és mértékben gátlódnak. Ezzel párhuzamosan más enzimek, pl. glutation-reduktáz ill. gvajakol-peroxidáz aktivitása mind szalicilsav, mind több rokon vegyületének hatására megnövekedett. Mindez alapot ad arra a következtetésre, hogy a szalicilsav típusú vegyületek hatásmechanizmusa legalábbis részben az, hogy a csökkent katalázaktivitás hatására átmenetileg megnő a  $\text{H}_2\text{O}_2$  mennyisége, ami viszont mint jelátvivő molekula, képes más védekező rendszereket aktiválni.

Meg kell jegyezni azt is, hogy normál hőmérsékleten a fenti vegyületek hatására csökken a fotoszintetikus aktivitás, és ezzel együtt a növekedés mértéke is. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a hideg elleni védő hatásnak ára van: ugyanazon kezelés, amely jelentősen csökkenteni képes az alacsony hőmérséklet károsító hatásait, normál hőmérséklet mellett stresszként jelentkezik.

## ***6.2. Az AG termolumineszcencia sáv változása mint a különböző stresszfaktorok indikátora***

Termolumineszcenciát (TL) fotoszintetizáló anyagból hagyományosan általában a mintának jóval fagypontra aló hűtése után mérnek (Demeter és Govindjee, 1989; Vass és Govindjee, 1996; Ducruet, 2003). Az újabb vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a fagyasztás bizonyos esetekben jelentős mértékben befolyásolhatja a növények TL kibocsátását (Ducruet és mtsai., 1998; Homann, 1999).

Kísérleteinkben az előzetes fagyasztás különböző TL komponensekre gyakorolt hatásait tanulmányoztuk különböző növényfajokon. Búzát és kukoricát összehasonlítva megállapítottuk, hogy a két faj távoli vörös fény által indukált TL görbéje már a kontroll körülmények között lévő növényekben is jellegzetesen eltért: búzában a B-sáv csúcshőmérséklete jelentősen alacsonyabb volt, mint kukoricában. Fagyasztás után búzában a membránkárosodásból eredő protongradiens megszűnésének köszönhetően ez az érték a magasabb hőmérsékletek irányába tolódott. A 40-45 °C körüli csúcshőmérséklettel jellemezhető AG-sáv búzanövényekben fagyasztás után is kimutatható volt, szemben a hidegérzékeny kukoricával, ahol már egy rövid idejű -1,5 °C-os fagyhatás is szignifikáns hatással van a távoli vörös fény által indukált TL görbére: az AG-sáv amplitúdója jelentősen lecsökken, csúcspozíciója a magasabb hőmérsékletek irányába tolódott. Alacsonyabb hőmérsékleti kezelések hatására kukoricában az AG-sáv fokozatosan tovább csökken, majd egy küszöbérték alatt teljesen eltűnt. A B-sáv jelentősen alacsonyabb hőmérsékleti fagyasztás után kezdett csak csökkenni, mint az AG-sáv. Ez jól látszik abból, hogy -3,3 °C-os fagyasztás után, mikor az AG-sáv már teljesen eltűnt, a B-sáv még nem változott. Egy küszöbérték alatt azonban egy hirtelen

amplitúdócsökkenés következett be, de szemben az AG-sávval, a B-sáv még jóval alacsonyabb hőmérsékletek mellett is detektálható volt. Borsó növényekben a távoli vörös fénnel indukált AG-sáv viselkedése a búzáéval egyezett meg, muskátliban viszont egy kritikus hőmérséklet alatt TL jel egyáltalán nem volt detektálható. A távoli vörös fénnel indukált TL görbe fagyasztásra történő viselkedése uborka és tök esetében a kukoricára és a búzára (ill. borsóban) jellemző görbék közé esett: a csökkenő hőmérséklettel az AG-sáv fokozatosan csökkent, majd akárcsak a kukoricában, egy küszöbérték alatt teljesen eltűnt. A távoli vörös fény által indukált B-sáv azonban, akárcsak a búzában vagy a borsóban felfelé tolódott. Ennek amplitúdója gyakorlatilag nem csökkent szignifikánsan. Mindezzel szemben érdekes módon az egy elektronátmenetet megengedő ún. single turnover fényfelvillanással (*flash*-sel) indukált B-sáv nem mutatta ugyanezt a felfele tolódást. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy intakt levelekben a *flash* gerjesztés egy összetett sávot eredményez, melynek magasabb hőmérsékleti komponense tulajdonképpen egy AG-sáv.

Szárazság és rövid idejű hőstressz hatására, az alacsony hőmérsékleti stresszhez hasonlóan az AG-sáv érzékenyebben reagált, mint a B-sáv. Azonban a fagyasztással ellentétben, ahol egy kritikus hőmérséklet alatt hirtelen következett be a csökkenés, a hőmérsékletnek az optimális fölé való emelésével egy fokozatos, hőmérsékletfüggő AG csökkenést kapunk, melynek hatására kb. 35 °C fölött az AG-sáv az amúgy melegkedvelő kukoricában is, de az inkább hidegtűrő búzában különösen, jelentős mértékben lecsökken. Kukoricában mind a magas hőmérsékleti előkezelés, mind a szárazság az AG-sáv csúcshőmérsékletének magasabb hőmérséklet felé tolódását eredményezi. Búzában ilyen változást nem figyeltünk meg.

Az alacsony hőmérsékleti, de fagypont feletti stressz (*chilling*) hatását kukoricanövényekben vizsgálva megállapítottuk, hogy az előzetesen rövid ideig alacsony hőmérsékleten tartott növényekben a távoli vörös fénnel indukált AG-sáv amplitúdója emelkedést mutatott, mialatt a csúcshőmérséklete az alacsonyabb hőmérsékletek felé tolódott. Az 1 *flash*-sel indukált B-sáv emelkedést nem mutatott, de kismértékű sáveltolódás megfigyelhető volt. Tartós stresszhatás következtében mind a B, mind az AG-sáv eltűnik, ill. megjelenik a lipidperoxidációra utaló magas hőmérsékleti HTL-sáv. Ez különösen azokban a levélrészekben volt jelentős, ahol már a hidegstresszre jellemző vízvesztés is bekövetkezett. Mind kukoricanövényeken, mind transzgenikus dohányokon bemutattuk, hogy a HTL-sávok megjelenése, valamint az AG-sáv eltűnése mind a hidegtűrő genotípusban, mind az alacsony hőmérséklethez edzett növényekben később következnek be.

### **6.3. Az antioxidáns enzimek szerepe gazdasági növények abiotikus stressztoleranciájában**

A megfelelő mértékű télállóság kialakításához még a kiváló fagyállósággal rendelkező őszi gabonafajták esetében is fontos, hogy mielőtt fagypont alatti hőmérsékletre kerülnének, bizonyos idejű alacsony, de még fagypont feletti hőmérsékleten történő edzési perióduson essenek át. Ismert, hogy az alacsony hőmérséklet nemcsak a hidegérzékeny, hanem a hidegtűrő növényekben is megnöveli a reaktív oxigénfajták mennyiségét. Vizsgálataink első erre vonatkozó kísérletsorozatában azt tanulmányoztuk, hogy milyen kapcsolat van a gabonafélék fagyállósága és egyes antioxidáns enzimek aktivitása között. Az edzett és edzetlen növényeket összehasonlítva megállapítottuk, hogy a bokrosodási csomó esetében a vizsgált enzimek közül edzés hatására jelentős növekedést a GST, a levélben szintén a GST, továbbá a POD és az APX mutatott. Az egyes antioxidáns enzimek közül azonban csak a hidegdedzett növények leveléből kivont APX és POD enzimek aktivitása mutatott szoros korrelációt a fagyállósággal. A fitotroni körülmények között kapott vizsgálataink eredményei szerint a különböző antioxidáns enzimek edzés során bekövetkező változásai azt mutatják, hogy az egyes gabonafajok eltérő stratégiát dolgoztak ki a reaktív oxigénformák mennyiségének szabályozásához. A későbbi vizsgálatokban mindezt újabb, több genotípus bevonásával végzett fitotroni és szántóföldi kísérletekkel is megerősítettük.

Az előzőekhez kapcsolódóan kiegészítő kísérletként kukorica hibridek és beltenyésztett vonalaik hidegtűrését, valamint antioxidáns kapacitását vizsgáltuk. Ehhez kilenc beltenyésztett vonalat és az ezekből létrehozott hibridet neveltünk, majd hidegkezeltünk fitotroni körülmények között. Megállapíthatjuk, hogy egyrészt a hibridek hidegtűrése rendszerint meghaladja a szülőkéét, másrészt a hibridek hidegtűrése rendszerint kiegyenlítettebb, mint a beltenyésztett vonalaké. A kukorica esetében is igazolható, hogy bizonyos antioxidáns enzimek aktivitása már enyhe hideghatásra megnövekszik. Drasztikus stresszhatásra azonban már aktivitáscsökkenés tapasztalható. Ha a kukoricánövények hidegtűrési és antioxidáns adatait egybevetjük, azt mondhatjuk, hogy a két paraméter közvetlenül nincs összefüggésben egymással: az antioxidáns értékekből kukoricavonalak, illetve hibridek hidegtűrésére nem lehet biztonsággal következtetni. Ebből adódik, hogy bár a magas antioxidáns aktivitás feltehetőleg hozzájárul az alacsony hőmérsékleti stresszt kísérő oxidatív károsodás jobb elviseléséhez, de önmagában nem elégséges a kellő mértékű hidegtoleranciához. Emiatt egy adott antioxidáns enzim aktivitását mint hidegtűrési markert a gyakorlat számára nem javasoljuk.

Különböző stresszorok hatásainak összehasonlítása érdekében kiegészítő összehasonlító vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy míg a polietilén-glikol kezeléssel indukált drasztikus szárazságstressz is önmagában csupán kismértékű változást okozott az egyes antioxidáns enzimek aktivitásában, *Drechslera tritici-repentis* (DTR) gombafertőzés azonban már kismértékű stressz esetén is a jelentős aktivitásemelkedést váltott ki.

Régóta ismert, hogy a gabonafélék fagyállóságát nemcsak a genetikai háttér, hanem a környezeti tényezők is befolyásolják. Az egyik legfontosabb környezeti tényező a fény. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a búzánövények fagyállóságát tekintve alacsony fényintenzitás mellett az alacsony hőmérsékleti edzés hatékonysága jelentősen gyengébb, illetve, hogy a fagyállóság fokozható nemcsak alacsony hőmérsékleti edzéssel, hanem normál hőmérsékleten viszonylag magas fényintenzitáson történő neveléssel is. További vizsgálataink során a fény szerepét tanulmányoztuk néhány olyan élettani paraméter változásában, melyek összefüggésbe hozhatók a búza fagyállóságának kialakulásával. Beállítottunk egy olyan kísérleti rendszert, amelyben a fényintenzitás szerepe jól detektálható. Kimutattuk, hogy a távoli vörös fénnel gerjeszthető AG termolumineszcencia sáv csúcshőmérséklete a hidegben és fényen, azaz normál megvilágítás mellett edzett növényekben alacsonyabb hőmérsékleten van. Mindez a ciklikus elektrontranszportlánc fokozott működésére utal. Ezt az eredményt P700 méréssel is megerősítettük.

A vizsgálatok folytatásaként arra kerestünk választ, hogy a fény milyen egyéb élettani, biokémiai folyamatokon keresztül járul hozzá a megnövekedett fagyállóság kialakulásához. Ismert, hogy a membránlipidek kulcsszerepet játszanak a hőmérsékleti adaptációban. Korábbi saját és mások általi vizsgálatok azt mutatták, hogy gabonafélékben alacsony hőmérsékleti edzés során a foszfatidil-glicerol lipidosztályban lecsökken a 16:1/16:0 arány (Huner és mtsai., 1989; Szalai és mtsai., 2001). Mostani vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy ennek a változásnak a mértéke nemcsak hőmérséklet, hanem fényfüggő is: alacsony hőmérsékleti edzés során fényben a csökkenés nagyobb mértékű volt, mint sötétben, valamint ez a változás normál hőmérsékleten is bekövetkezhet, ha a fényintenzitás magas. A több vizsgált lipidfrakció közül további jelentős változást a foszfatidil-etanolamin frakció mutatott: itt hidegedzés hatására jelentős telítetlenség-növekedés volt kimutatható, de kizárólag fényben és alacsony hőmérsékleten történő edzés során.

A lipidekhez hasonlóan az egyes antioxidáns enzimek aktivitásának alacsony hőmérsékleten bekövetkező változása is fényfüggést mutatott: a fagyállósággal megegyező mértékben alacsony hőmérsékleten fényben emelkedett leginkább az aszkorbát-peroxidáz,

glutation-reduktáz enzimek aktivitása, míg meglepő módon a gvajakol-peroxidáz aktivitása legnagyobb mértékben sötét hidegben nőtt meg.

Mind az antioxidáns enzimek alacsony hőmérsékleten bekövetkező változásai, mind számos egyéb védekező mechanizmus aktiválása kapcsolatba hozható egy jelátvivő anyag, a szalicilsav működésével. Ezért az adott kísérleti rendszerünkben vizsgáltuk egyrészt a szalicilsav, másrészt ennek egy feltételezett prekursorának az orto-hidroxi-fahéjsavnak a változását is. A szalicilsav mind szabad, mind kötött formában fény- és hidegfüggést egyaránt mutatott. A legszembetűnőbb változást azonban az orto-hidroxi-fahéjsav kötött formája mutatta: fényben történő hidegedzés során mennyisége több nagyságrenddel meghaladta a kontroll értéket. Mindezek az eredmények megerősítik azt a feltételezésünket, hogy a szalicilsavfüggő jelátviteli út szerepének tanulmányozásakor nemcsak magára a szalicilsavra, hanem egyes prekursorainak a változásaira is figyelemmel kell lenni.

## 7. Új tudományos eredmények és következtetések

- Kimutattuk, hogy fiatal kukoricanövényekben a szalicilsav mellett több rokon szerkezetű vegyület, köztük egyes lehetséges prekursorok, mint pl. a benzoésav vagy az orto-hidroxi-fahéjsav, képes az alacsony hőmérsékleti stressz károsító hatásait csökkenteni.
- Igazoltuk az antioxidáns rendszer szerepét a szalicilsav és rokon vegyületek által indukált hidegtűrésben.
- Bizonyítottuk, hogy intakt levelekben az egy elektronátmenetet megengedő fényfelvillanás általi gerjesztés egy összetett termolumineszcencia sávot eredményez, melynek magasabb hőmérsékleti (40 °C körüli) komponense egy AG-sáv. Jellemeztük az AG termolumineszcencia sávot, és bemutattuk alkalmazását gazdasági növények stressztűrő képességének vizsgálatában.
- Több gazdasági növény, elsősorban kukorica és búza esetében jellemeztük az antioxidáns enzimrendszerek hozzájárulását abiotikus stresszfaktorok elleni védelemben. Emellett térképeztük az aszkorbát-peroxidáz szintéziséért felelős géneket paradicsomban. Kimutattuk, hogy a különböző gabonafajok eltérő stratégiákat dolgoztak ki a reaktív oxigénformák mennyiségének szabályozásához.
- Igazoltuk a fény szerepét a búza maximális fagyállóságának kialakulásában. Ehhez kapcsolódóan bemutattuk a ciklikus elektrontranszportlánc, egyes antioxidánsok, a szalicilsav-metabolizmus, valamint a membránlipidek alakulását eltérő fényviszonyok melletti alacsony hőmérsékleti edzés során. Eredményeink azt mutatják, hogy a szalicilsavfüggő jelátviteli utak szerepének tanulmányozásakor nemcsak magára a szalicilsavra, hanem egyes prekursorainak a változásaira is figyelemmel kell lenni.



## Hivatkozások

- Ádám, A., Bestwick, C.S., Barna, B., Mansfield, J.W. (1995) Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolica. *Planta* 197: 240-249.
- Agarwal, S., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Meena, R.C. (2005a) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biol. Plant.* 49: 541-550.
- Agarwal, S., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Tyagi, A., Meena, R.C. (2005b) Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. *Plant Sci* 169: 559-570.
- Alibert, G., Ranjeva, R. (1971) Recherches sur les enzymes catalysant la biosynthese des acides phenoliques chez *Quercus pedunculata* (Ehrn): I – Formation des series cinnamique et benzoique. *FEBS Lett.* 19: 11-14.
- Alibert, G., Ranjeva, R., Boudet, A. (1972) Studies on enzymes catalyzing phenolic acids formation in *Quercus pedunculata* (Ehrh.) II. Intracellular location of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and “benzoate synthase”. *Biochem Biophys. Acta* 279: 282-289.
- Alvarez, M., Pennell, R., Meijer, P., Ishikawa, A., Dixon, R., Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.
- Al-Hakimi, A.M.A., Hamada, A.M. (2001) Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamin or sodium salicylate. *Biol. Plant.* 44: 253-261.
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P. (2002) Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 159: 685-693.
- Ananieva, E.A., Christov, K.N., Popova, L.P. (2004) Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *J. Plant Physiol.* 161: 319-328.
- Anderson, M.D., Chen, Z., Klessig, D.F. (1998) Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochem.* 47: 555-566.
- Apostol, S., Szalai, G., Sujbert, L., Popova, L.P., Janda, T. (2006) Non-invasive monitoring of the light-induced cyclic photosynthetic electron flow during cold hardening in wheat leaves. *Z Naturforsch* 61c: 734-740.
- Arberg, B. (1981) Plant Growth Regulators. Monosubstituted benzoic acid. *Swed. Agric. Res.* 11: 93-105.
- Arnold, W., Sherwood, H. (1957) Are chloroplasts semiconductors? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 29-35.
- Aroca, R., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M. (2001) Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. *Plant Sci.* 161: 719-726.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- Baek, K.H., Skinner, D.Z. (2003) Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci.* 165: 1221-1227.
- Bandurska, H., Stroinski, A. (2005) The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiol. Plant.* 27: 379-386.

- Barth, C., Krause, G.H. (1999) Inhibition of photosystem I and II in chilling-sensitive and chilling tolerant plants under light and low-temperature stress. *Z. Naturforsch.* 54c: 645-657.
- Bassett, C.L., Nickerson, M.L., Farrell, R.E., Artlip, T.S., El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (2005) Characterization of an S-locus receptor protein kinase-like gene from peach. *Tree Physiol.* 25: 403-411.
- Berry, J., Björkman, O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 491-543.
- Beauchamp, C., Fridovich, J. (1971) Superoxide dismutase. Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-278.
- Bielawski, W., Joy, K.W. (1986) Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of pea. *Phytochem.* 25: 2261-2265.
- Björn, L.O. (1971) Far-red induced, long-lived afterglow from photosynthetic cells. Size of afterglow unit and path of energy accumulation and dissipation. *Photochem. Photobiol.* 13: 5-20.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 126: 1024-1030.
- Böddi, B., Keresztes, Á., Csapó, B., Kovács, J., Páldi, E., Láng, F. (1997) Differences in the etioplast ultrastructure and chlorophyll biosynthesis time course of cold tolerant and cold sensitive maize lines under cold treatment. *Maydica* 42: 305-311.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bridger, G.M., Yang, W., Falk, D.E., McKersie, B.D. (1994) Cold-acclimation increases tolerance of activated oxygen in winter cereals, *J. Plant Physiol.* 144: 235-240.
- Bueno, P., Varela, J., Gimenez-Gallego, G., del Río, L.A. (1995) Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 108: 1151-1160.
- Bukhov N. G., Govindachary S., Rajagopal S., Joly D., Carpentier R. (2004) Enhanced rates of P700+ dark-reduction in leaves of *Cucumis sativus* L. photoinhibited at chilling temperature. *Planta* 218: 852-861.
- Chen, Z., Klessig, D.P. (1991) Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8179-8183.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. (1993a) Active oxygen species in the induction of plant systemic resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.
- Chen, Z., Ricigliano, J.R., Klessig, D.F. (1993b) Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9533-9537.
- Chen, Z., Iyer, S., Caplan, A., Klessig, D.F., Fan, B. (1997) Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol.* 114: 193-201.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K. (2006) Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiol. Plant.* 126: 52-61.
- Chong, J., Pierrel, M.-A., Atanassova, R., Werck-Reichhart, D., Fritig, B., Saindrenan, P., (2001) Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol.* 125: 318-328.
- Chory, J. (1997) Light modulation of vegetative development. *Plant Cell* 9: 1225-1234.

- Christianson, M.L., Duffy, S.H. (2002) Dose-dependent effect of salicylates in a moss, *Funaria hygrometrica*. J. Plant Growth regul. 21: 200-208.
- Chung, E., Park, J.M., Oh, S.K., Joung, Y.H., Lee, S., Choi, D. (2004). Molecular and biochemical characterization of the *Capsicum annuum* calcium-dependent protein kinase 3 (CaCDPK3) gene induced by abiotic and biotic stresses. Planta 220: 286-295.
- Clarke, S.M., Mur, L.A.J., Wood, J.E., Scott, I.M. (2004) Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 38: 432-447.
- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J.R., Klessig, D.F. (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7143-7147.
- Coquoz, J.L., Buchala, A., Métraux, P. (1995) Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. Phytopathol. 85: 1219-1224.
- Cornic, G., Bukhov, N.G., Wiese, C., Bligny, R., Heber, U. (2000) Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C-3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping Planta 210: 468-477.
- Cronje, M.J., Bornman, L. (1999) Salicylic acid influences Hsp70/Hsc70 expression in *Lycopersicon esculentum*: dose- and time-dependent induction or potentiation. Biochem Biophys. Res. Commun. 265: 422-427.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., Scott, I.M. (1998a) Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. Plant Physiol 116: 1351-1357.
- Dat, J.F., Foyer, C.H., Scott, I.M. (1998b) Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. Plant Physiol. 118: 1455-1461.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., Scott, I.M. (2000) Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. J. Plant Physiol. 156: 659-665.
- Deisseroth, A., Dounce, A. (1970) Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. Physiol. Rev. 50: 319-326.
- Demeter, S., Govindjee (1989) Thermoluminescence in plants. Physiol. Plant. 75: 121-130.
- Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 18: 547-575.
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C., Smith, D.L. (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Planta 214: 895-901.
- Doulis, A.G., Debian, N., Kingston-Smith, A.H., Foyer, C.H. (1997) Differential localization of antioxidants in maize leaves. Plant Physiol. 114: 1031-1037.
- Dubcovsky, J., Luo, M.C., Dvorak, J. (1995) Linkage relationships among stress-induced genes in wheat. Theor. Appl. Genet. 91: 795-801.
- Ducruet, J.-M., Miranda, T. (1992) Graphical and numerical analysis of thermoluminescence and fluorescence F<sub>o</sub> emission in photosynthetic material. Photosynth. Res. 33: 15-27.
- Ducruet, J.-M., Janda, T., Páldi, E. (1997) Whole leaf thermoluminescence as a prospective tool for monitoring intraspecific cold tolerance in crop species. Acta Agron. Hung. 45: 463-466.
- Ducruet, J.-M., Toulouse, A., Roman, M. (1998) Thermoluminescence of plant leaves: instrumental and experimental aspects. In: Garab, G. (ed.) Photosynthesis: Mechanisms and Effects. Vol. V., Kluwer Academic Press, Amsterdam, 4353-4356.
- Ducruet, J.-M., Vavilin, D. (1999) Chlorophyll high-temperature thermoluminescence emission as an indicator of oxidative stress: perturbing effects of oxygen and leaf water content. Free Rad. Res. 31: 187-192.

- Ducruet, J.-M. (2003) Chlorophyll thermoluminescence of leaf discs: simple instruments and progress in signal interpretation open the way to new ecophysiological indicators. *J. Exp. Bot.* 54: 2419–2430.
- Ducruet, J.-M., Roman, M., Ortega, J.M., Janda, T. (2005a) Role of the oxidized secondary acceptor Q<sub>B</sub> of Photosystem II in the delayed "afterglow" chlorophyll luminescence. *Photosynth. Res.* 84: 161-166.
- Ducruet, J.-M., Roman, M., Havaux, M., Janda, T., Gallais, A. (2005b) Cyclic electron flow around PSI monitored by afterglow luminescence in leaves of maize inbred lines (*Zea mays* L.): correlation with chilling tolerance. *Planta* 221: 567-579.
- Durner, J., Klessig, D.F. (1996) Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.* 271: 28492-28501.
- Durner, J., Shah, J., Klessig, D.F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 266-274.
- El-Tayeb, M.A. (2005) Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regul.* 45: 215-224.
- El-Tayeb, M.A., El-Enany, A.E., Ahmed, N.L. (2006) Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Growth Regul.* 50: 191-199.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., Raskin, I. (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2480-2484.
- Enyedi, A.J. (1999) Induction of salicylic acid biosynthesis and systemic acquired resistance using the active oxygen species generator rose bengal. *J. Plant Physiol.* 154: 106-112.
- Eshed, Y., Zamir, D. (1994) A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping genes. *Euphytica* 79: 175-179.
- Eshed, Y., Zamir, D. (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141: 1147-1162.
- Fariduddin, Q., Hayat, S., Ahmad, A. (2003) Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* 41: 281-284.
- Finazzi, G., Barbagallo, R.P., Bergo, E., Barbato, R., Forti, G. (2001) Photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* in State 1 State 2. *J. Biol. Chem.* 276: 22251-22257.
- Finazzi, G., Rappaport, F., Furia, A., Fleischmann, M., Rochaix, J.D., Zito, F., Forti, G. (2002) Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Rep.* 31: 280-285.
- Foley, S., Navaratnam, S., McGarvey, D.J., Land, E.J., Truscott, G., Rice-Evans, C.A. (1999) Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1202-1208.
- Foyer, H.C., Lelandais, M., Galap, C., Kunert, K.J. (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.* 97: 863-872.
- Foyer, C.H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., Pruvost, C., Jouanin, L. (1995) Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol.* 109: 1047–1057.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254.

- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic link between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Fung, R.W.M., Wang, C.Y., Smith, D.L., Gross, K.C., Tian, M.S. (2004) MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 166: 711-719.
- Gadea, J., Conejero, V., Vera, P. (1999) Developmental regulation of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato plants. *Mol. Gen. Genet.* 262: 212-219.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Galiba, G., Quarrie, S.A., Sutka, J., Morgounov, A., Snape, J.W. (1995) RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 90: 1174-1179.
- Galiba, G., Kerepesi, I., Snape, J.W., Sutka, J. (1997) Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Gen.* 95: 265-270.
- Galiba, G., Kocsy, G., Kerepesi, I., Vágújfalvi, A., Cattivelli, L., Sutka, J. (2002) Involvement of glutathione and carbohydrate biosynthesis moreover COR14B gene expression in wheat cold acclimation. In: Li, P.H., Palva, E.T. (eds.) *Plant Cold Hardiness. Gene Regulation and Genetic Engineering*. KluwerAcad/Plenum Publ. New York, 139-159.
- Galiba, G., Kerepesi, I., Snape, J.W., Vágújfalvi, A. (2005) Deletion analysis of genes regulating cold- and PEG-induced carbohydrate accumulation in hydroponically raised wheat seedlings. *Acta Agron. Hung.* 53: 359-370.
- Ganesan, V., Thomas, G. (2001) Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and oxidative stress. *Plant Sci.* 160: 1095-1106.
- Garretón, V., Carpinelli, J., Jordana, X., Holuigue, L. (2002): The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiol.* 130: 1516-1526.
- Gaudet, D.A., Laroche, A., Frick, M., Huel, R., Puchalski, B. (2003) Plant development affects the cold-induced expression of plant defence-related transcripts in winter wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62: 175-184.
- Gray, G.R., Chauvin, L.-P., Sarhan, F., Huner, N.P.A. (1997) Cold acclimation and freezing tolerance. A complex interaction of light and temperature. *Plant Physiol.* 114: 467-474.
- Guan, L., Scandalios, J.G. (1995) Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5930-5934.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G., Cicek, N. (2006) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J. Plant Physiol.* (in press).
- Gutiérrez-Coronado, M., Trejo, C.L. Larqué-Saavedra, A. (1998) Effects of salicylic acid on growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 563-565.
- Guy, C.L., Niemi, K.J., Brambl, R. (1985) Altered gene expression during cold acclimation in spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3673-3677.
- Hamada, A.M. (1998) Effects of exogenously added ascorbic acid, thiamin or aspirin on photosynthesis and some related activities of drought-stressed wheat plants. In: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Garab, G. ed.). Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Vol. 4. pp. 2581-2584.
- Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B., Ahmad, A. (2005) Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agron. Hung.* 53: 433-437.
- Hayat, S., Ahmad, A. (eds.) (2007) *Salicylic acid: A plant hormone*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 401p.

- Hegedűs, A., Erdei, S., Janda, T., Szalai, J., Dudits, D., Horváth, G. (2002) Effects of low temperature stress on ferritin or aldose reductase overexpressing transgenic tobacco plants. *Acta Biol. Szeged.* 46: 97-98.
- Hideg, É., Vass, I. (1993) The 75°C thermoluminescence band of green tissues: chemiluminescence from membrane-chlorophyll interaction. *Photochem. Photobiol.* 58: 280-283.
- Holá, D., Langrová, K., Kočová, M., Rothová, O. (2003) Photosynthetic parameters of maize (*Zea mays* L.) inbred lines and F-1 hybrids: their different response to, and recovery from rapid or gradual onset of low-temperature stress. *Photosynthetica* 41: 429-442.
- Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., Benešová, M., Bartáková, J., Wilhelmová, N. (2004) Different reponse of inbred and hybrid maize to chilling periods of various duration. *Acta Physiol. Plant.* 26Suppl.: 227-228.
- Holá, D., Kočová, M., Rothová, O., Wilhelmová N., Benešová, M. (2007) Recovery of maize (*Zea mays* L.) inbreds and hybrids from chilling stress of various duration: Photosynthesis and antioxidant enzymes. *J. Plant Physiol.* 164: 868—877.
- Holuigue, L., Salinas, P., Blanco, F., Garretón, V. (2007) Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. In: Hayat, S., Ahmad, A. (eds.) *Salicylic acid: A plant hormone*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 197-246.
- Homann, P. (1999) Reliability of Photosystem II thermoluminescence measurements after sample freezing: Few artifacts with Photosystem II membranes but gross distortions with certain leaves. *Photosynth. Res.* 62: 219-229.
- Hong, Z.L., Lakkineni, K., Zhang, Z.M., Verma, D.P.S. (2000) Removal of feedback inhibition of DELTA1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122: 1129-1136.
- Horváth, E., Szalai, G., Janda, T., Páldi, E. (2002) In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci.* 163: 1129-1135.
- Horváth, E. (2004) Alacsony hőmérséklet hatásait befolyásoló tényezők vizsgálata búzában (*Triticum aestivum* L.) és kukoricában (*Zea mays* L.) PhD értekezés, ELTE TTK.
- Horváth, E., Szalai, G., Janda, T. (2007) Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signalling. *J. Plant Growth Regul.* (in press).
- Huner, N.P.A., Williams, J.P., Maissan, E.E., Myscich, E.G., Krol, M., Laroche, A., Singh, J. (1989) Low temperature-induced decrease in trans- $\Delta^3$ -hexadecenoic acid content is correlated with freezing tolerance in cereals. *Plant Physiol.* 89: 144-150.
- Huner, N.P.A., Öquist, G., Hurry, V.M., Krol, M., Falk, S., Griffith, M. (1993) Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynth. Res.* 37, 19-39.
- Huner, N.P.A., Öquist, G., Sarhan, F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci.* 3: 224-230
- Ishizaki-Nishizawa, O., Fujii, T., Azuma, M., Sekiguchi, K., Murata, N., Ohtani, T., Toguri, T. (1996) Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nature Biotech.* 14: 1003-1006.
- Ivanov, A. G., Sane, P., Hurry, V., Krol, M., Sveshnikov, D., Huner, N. P. A., Öquist G. (2003) Low-temperature modulation of the redox properties of the acceptor side of photosystem II: photoprotection through reaction centre quenching of excess energy. *Physiol. Plant.* 119: 376-383.
- Jagendorf, A.T., Takabe, T., (2001) Inducers of glycinebetaine synthesis in barley. *Plant Physiol.* 127: 1827-1835.

- Janda, T., Wiessner, W., Páldi, E., Mende, D., Demeter, S. (1992) Thermoluminescence investigation of photoinhibition in the green alga, *Chlamydomonas stellata* and in *Pisum sativum* L. leaves. *Z. Naturforsch.* 47c: 585-590.
- Janda, T., Szalai, G., Kissimon, J., Páldi, E., Marton, C., Szigeti, Z. (1994a) Role of light intensity in the chilling injury of young maize plants studied by chlorophyll fluorescence induction measurements. *Photosynthetica* 30: 293-299.
- Janda, T., Kissimon, J., Szigeti, Z., Veisz, O., Páldi, E. (1994b) Characterization of cold hardening in wheat using fluorescence induction parameters. *J. Plant Physiol.* 143: 385-388.
- Janda, T. (1996) Alacsony hőmérséklet és fénystressz hatása zöld növények fotoszintézisére. Kandidátusi értekezés.
- Janda T., Szalai, G., Tari, I., Páldi, E. (1997) Exogenous salicylic acid has an effect on chilling symptoms in maize (*Zea mays* L.) plants. In: Sowinski, P., Zagdanska, B., Aniol, A. Pithan, K. (eds.) *Crop Development for Cool and Wet European Climate*, ECSP-EEC-EAEC, Brussels, Belgium pp. 179-187.
- Janda, T. (1998) Use of chlorophyll fluorescence induction techniques in the study of low temperature stress in plants. *Acta Agron. Hung.* 46: 77-91.
- Janda, T., Szalai, G., Ducruet, J.-M., Páldi, E. (1998) Changes in photosynthesis in inbred maize lines with different degrees of chilling tolerance grown at optimum and suboptimum temperatures. *Photosynthetica* 35: 205-212.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Páldi, E. (1999a) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208: 175-180.
- Janda, T., Szalai, G., Giauffret, C., Páldi, E., Ducruet, J.-M. (1999b) The thermoluminescence 'afterglow' band as a sensitive indicator of abiotic stresses in plants. *Z. Naturforsch.* 54c: 629-633.
- Janda, T., Szalai, G., Antunovics, Z., Horváth, E., Páldi, E. (2000a) Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica* 45: 29-33.
- Janda, T., Szalai, G., Páldi, E. (2000b) Thermoluminescence investigation of low temperature stress in maize. *Photosynthetica* 38: 635-639.
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzalez, K., Veisz, O., Páldi, E. (2003) Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci.* 164: 301-306.
- Janda, T., Szalai, G., Papp, N., Pál, M., Páldi, E. (2004) Effects of freezing on thermoluminescence in various plant species. *Photochem. Photobiol.* 80, 525-530.
- Janda, T., Kósa, E., Pintér, J., Szalai, G., Marton, C.L., Páldi, E. (2005a) Antioxidant activity and chilling tolerance of young maize inbred lines and their hybrids. *Cereal Res Com* 33: 541-548.
- Janda T., Kósa E. I., Szalai G., Páldi E. (2005b) Investigation of antioxidant activity in maize during low temperature stress. *Acta Biol. Szegediensis* 49: 53-54.
- Janda, T., Horváth, E., Szalai, G., Páldi, E. (2007a) Role of salicylic acid in the induction of abiotic stress tolerance. In: Hayat, S., Ahmad, A. (eds.) *Salicylic acid: A plant hormone*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 91-150.
- Janda, T., Szalai, G., Leskó, K., Yordanova, R., Apostol, S., Popova, L.P. (2007b) Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochemistry* 68: 1674-1682.
- Janowiak, F., Dörrfling, K. (1996) Chilling of maize seedlings: Changes in water status and abscisic acid content in ten genotypes differing in chilling tolerance. *J. Plant Physiol.* 147: 582-588.
- Janowiak, F., Maas, B., Dörrfling, K. (2002) Importance of abscisic acid for chilling tolerance of maize seedlings. *J. Plant Physiol.* 159: 635-643.

- Jiang, M., Zhang, J. (2002) Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* 215: 1022–1030.
- Jonak, C., Ökrész, L., Bögre, L., Hirt, H. (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 415–424.
- Kang, H.M., Saltveit, M.E. (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiol. Plant.* 115: 571–576.
- Kang, G.Z., Wang, C.H., Sun, G.C., Wang, Z.X. (2003a) Salicylic acid changes activities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environm. Exp. Bot.* 50: 9–15.
- Kang, G.Z., Wang, Z.X., Sun, G.C. (2003b) Participation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in enhancement of cold chilling by salicylic acid in banana seedlings. *Acta Bot. Sin.* 45: 567–573.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., Mullineaux, P. (1999) Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654–657.
- Keles, Y., Öncel, I. (2002) Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* 163: 783–790.
- Khan, W., Prithviraj, B. Smith, D.L. (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J. Plant Physiol.* 1485–492.
- Kim, H., Mun, J.H., Byun, B.H., Hwang, H.J., Kwon, Y.M., Kim, S.G. (2002) Molecular cloning and characterization of the gene encoding osmotin protein in *Petunia hybrida*. *Plant Sci.* 162: 745–752.
- Kitagawa, Y., Yoshizaki, K. (1998) Water stress induced chilling tolerance in rice: putative relationship between chilling tolerance and Ca<sup>2+</sup> flux. *Plant Sci.* 137: 73–85.
- Klapheck, S., Yimmer, I., Cosse, H. (1990) Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 31: 1005–1012.
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. (2000) Nitric oxid and salicylic acid signalling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8849–8855.
- Knight, H., Knight, M.R. (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6: 262–267.
- Kocsy, G., Brunner, M., Rügsegger, A., Stamp, P., Brunnold, C. (1996) Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivities to chilling. *Planta* 198: 365–370.
- Kocsy, G., Owtrim, G., Brander, K., Brunold, C. (1997) Effect of chilling on the diurnal rhythm of enzymes involved in protection against oxidative stress in a chilling-tolerant and a chilling-sensitive maize genotype. *Physiol Plant* 99: 249–254.
- Kocsy, G., Szalai, G., Vágúfalvi, A., Stéhli, L., Orosz, G., Galiba, G. (2000a) Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* 210: 295–301.
- Kocsy, G., von Ballmoos, P., Suter, M., Rügsegger, A., Galli, U., Szalai, G., Galiba, G., Brunold, C. (2000b) Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* 211: 528–536.
- Kocsy, G., von Ballmoos, P., Rügsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., Brunold, C. (2001a) Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. *Plant Physiol.* 127: 1147–1156.
- Kocsy, G., Galiba, G., Brunold, C. (2001b) Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol. Plant.* 113: 158–164.



- Korkmaz, A. (2005) Inclusion of acetyl salicylic acid and methyl jasmonate into the priming solution improves low temperature germination and emergence of sweet pepper. *HortScience* 40: 197-200.
- Körnerová, M., Holá, D. (1999) The effect of low temperature on Hill reaction and photosystem I activities and pigment contents in maize inbred lines and their F1 hybrids. *Photosynthetica* 37: 477-488.
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G., Popova, L. (2007) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J. Plant Physiol.* (in press).
- Kratsch, H.A., Wise, R.R. (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell Environ.* 23: 337-350.
- Krieger, A., Bolte, S., Dietz, K.J., Ducruet, J.M. (1998) Thermoluminescence studies on the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* 205:587-594.
- Krupa, Z., Huner, N.P.A., Williams, J.P., Maissan, E., James, D.R. (1987) Development at cold hardening temperature. The structure and composition of purified rye light harvesting complex II. *Plant Physiol.* 84: 19-24.
- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G.H., Barber, J. (2000) Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J. Biol. Chem.* 275: 6509-6514.
- Lamarck, J.B. (1778) In: *Flore Francaise* 3. L'Emprimerie Royale, Paris, pp. 537-539.
- Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschman, S., Grun, S., Sandermann, H. (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 567-575.
- Larcher, W. (1995) *Physiological Plant Ecology*. 3<sup>rd</sup> edition, Springer-Verlag, Berlin, 506p.
- Larkindale, J., Knight, M.R. (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.* 128: 682-695.
- Larkindale, J., Hall, J.D., Knight, M.R., Vierling, E. (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.* 138: 882-897.
- Larkindale, J., Huang, B.R. (2005) Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass. *Plant Growth Regul.* 47: 17-28.
- Leclercq, J., Ranty, B., Sanchez-Ballesta, M.T., Li, Z.G., Jones, B., Jauneau, A., Pech, J.C., Latche, A., Ranjeva, R., Bouzayen, M. (2005) Molecular and biochemical characterization of LeCRK1, a ripening-associated tomato CDPK-related kinase. *J. Exp. Bot.* 56: 25-35.
- Lee, D.H., Lee, C.B. (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* 159: 75-85.
- Lee, T.T., Skoog, F. (1965) Effect of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 18: 386-402.
- Lee, H., León, J., Raskin, I. (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4076-4079.
- León, J., Lawton, M.A., Raskin, I. (1995) Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108: 1673-1678.
- Lopez-Delgado, H., Dat, J., Foyer, C.H., Scott, I.M. (1998) Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Exp. Bot.* 49: 713-720.
- Luo, J.P., Jiang, S.T., Pan, L.J. (2001) Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzyme activities. *Plant Sci.* 161: 125-132.

- Lyons, J.M., Raison, J.K. (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45: 386-389.
- Lyons, J.M. (1973) Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 445-466.
- Lyons, J.M., Raison, J.K., Steponkus, P.L. (1979) The plant membrane in response to low temperature: An overview. In: Lyons, J.M., Graham, D., Raison, J.K. (eds.): *Low Temperature Stress in Crop Plants: the Role of the Membrane*. New York, Academic Press, pp.1-24.
- Luxova, M., Gasparikova, O. (1999) The effect of low temperature on root respiration in maize. *Biologia* 54: 453-458.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., Raskin, I. (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.
- Malamy, J., Klessig, D.F. (1992) Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* 2: 643-654.
- Mannervik, B., Guthenberg, C. (1981) Glutathione transferase (Human placenta). *Methods in Enzymol.* 77: 231-235.
- Manuel, N., Cornic, G., Aubert, S., Choler, P., Bligny, R., Heber, U. (1999) Protection against photoinhibition in the alpine plant *Geum montanum*. *Oecologia* 119, 149-158.
- Martin, B. (1987) Arrhenius plots and the involvement of thermotropic phase transitions of the thylakoid membrane in chilling impairment of photosynthesis in thermophilic higher plants. *Plant Cell Environ.* 9: 323-331.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M., Karpinski, S. (2006) Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J. Exp. Bot.* 57: 1795–1807.
- MATLAB (2006) [www.mathworks.com](http://www.mathworks.com)
- McCourt, P., Browse, J., Watson, J., Arntzen, C.J., Somerville, C.R. (1985) Analysis of photosynthetic antenna function in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L) lacking trans-hexadecenoic acid. *Plant Physiol.* 78: 853-858.
- McKersie, B.D., Bowley, S.R., Jones, K.S. (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 119: 839–847.
- Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006.
- Métraux, J.-P. (2002) Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 7:332-334.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., Dietz, K.J. (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* 132: 272-281.
- Meuwly, P., Métraux, J.-P. (1993) *Ortho*-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal. Biochem.* 214: 500-505.
- Miranda, T., Ducruet J.-M. (1995a) Characterization of the chlorophyll thermoluminescence afterglow in dark-adapted or far-red illuminated plant leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 689-699.
- Miranda, T., Ducruet J.-M. (1995b) Effects of dark- and light-induced proton gradients in thylakoids on the Q and B thermoluminescence bands. *Photosynth. Res.* 43: 251-262.
- Mishra, A., Choudhuri, M.A. (1997) Ameliorating effects of salicylic acid on lead and mercury-induced inhibition of germination and early seedling growth of two rice cultivars. *Seed Sci. Technol.* 25: 263-270.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M. (2000) Activities of SOD and the ascorbate-

- glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 110: 42-51.
- Mittova, V., Tal, M., Guy, M., Volokita, M. (2002a) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Rad. Res.* 36: 195-202.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M. (2002b) Salt-stress induces upregulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol. Plant.* 115: 393-400.
- Mittova, V., Theodoulou, F.L., Kiddle, G., Volokita, M., Tal, M., Foyer, C.H., Guy, M. (2004) Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt-tolerant relative, *L. pennellii* – a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. *Plant Cell Environ.* 27: 237–250.
- Moon, B.Y., Higashi, S., Gombos, Z., Murata, N. (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6219-6223.
- Moynihan, M.R., Ordentlich, A., Raskin, I. (1995) Chilling-induced heat evolution in plants. *Plant Physiol.* 108: 995-999.
- Munne-Bosch, S., Penuelas, J. (2003) Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta* 217: 758-766.
- Murata, N., Wada, H., Omata, T., Ono, T. (1983) Low temperature stress and membrane lipid phase in the blue-green algae. In: Marcelle, R., Clijsters, H., van Poucke, M (eds.) *Effects of Stress on Photosynthesis* pp. 193-199.
- Murata, N. (1989) Low-temperature effects on cyanobacterial membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 61-75.
- Najami, N., Janda, T., Valentina, M., Barriah, W., Tal, M., Guy, M., Volokita, M. (2003) The wild salt- and oxidative-stress tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* as a source of antioxidant genes: cloning of the genes encoding the ascorbate peroxidase and their functional analysis. *Free Radical Res* 37 Suppl. 2: 42-43.
- Najami, N., Janda, T., Barriah, W., Kayam, G., Tal, M., Guy, M., Volokita, M. (2007) Ascorbate peroxidase gene family in tomato: Its identification and characterization. *Mol. Genet. Genomics* (elkuldve).
- Nakano, Y., Asada, Y. (1987) Purification of ascorbate peroxidase from spinach chloroplasts: its activation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28: 131-140.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiol. Plant.* 126: 62-71.
- Németh, M., Janda, T., Horváth, E., Páldi, E., Szalai, G. (2002) Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Sci.* 162: 569-574.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. (1995) Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8: 227-233.
- Nishida, I., Murata, N. (1996) Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 541-568.
- Noctor, G., Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.

- Ohad, I., Koike, H., Shochat, S., Inoue, Y. (1988) Changes in the properties of reaction center II during the initial stages of photoinhibition as revealed by thermoluminescence measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 933: 288-298.
- Oidaira, H., Sano, S., Koshiba, T., Ushimaru, T. (2000) Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 156: 811-813.
- Okuda, T., Matsuda, Y., Yamanaka, A., Sagisaka, S. (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen-peroxide in leaves of winter-wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267.
- Overmyer, K., Brosché, M., Kangasjärvi, J. (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* 8: 335-342.
- Pál, M., Szalai, G., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E. (2002) Effect of salicylic acid during heavy metal stress. *Acta Biol. Szeg.* 46: 119-120.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. (2005) Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays* L.) plants. *Physiol. Plant.* 125: 356-364.
- Pan, Q., Zhan, J., Liu, H., Zhang, J., Chen, J., Wen, P., Huang, W. (2006) Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Sci.* 171: 226-233.
- Pancheva, T.V., Popova, L.P., Uzunova, A.M. (1996) Effect of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *J. Plant Physiol.* 149: 57-63.
- Pancheva, T.V., Popova, L.P. (1998) Effect of salicylic acid on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in barley leaves. *J. Plant Physiol.* 152: 381-386.
- Papp, I., Mur, L.A., Dalmadi, Á., Dulai, S., Koncz, Cs. (2004) A mutation in the *Cap Binding Protein 20* gene confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 55: 679-686.
- Pastori, G., Foyer, C.H., Mullineaux, P. (2000) Low temperature-induced changes in the distribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *J. Exp. Bot.* 51: 107-113.
- Pastori, G., Foyer, C.H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol.* 129: 460-468.
- Pastuglia, M., Roby, D., Dumas, C., Cock, J.M. (1997) Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* 9: 49-60.
- Pham-Quoc, K., Dubacq, J.-P., Demandre, C., Mazliak, P., (1994) Comparative effects of exogenous fatty-acid supplementations on the lipids from the *Cyanobacterium spirulina-platensis*. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 501-509.
- Pospíšil, P., Skotnica, J., Nauš, J. (1998) Low and high temperature dependence of minimum F<sub>O</sub> and maximum F<sub>M</sub> chlorophyll fluorescence in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1363: 95-99.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Stewart, C.R. (1994a) Acclimation, hydrogen peroxide and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* 105: 619-627.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. (1994b) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role for hydrogen peroxid. *Plant Cell* 6: 65-74.
- Prasad, T.K. (1996) Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10: 1017-1026.

- Quinn, P.J. (1988) Effects of temperature on cell membranes In: Long, S.P., Woodward, F.I. (eds.) *Plants and Temperature*. Symp. Soc. Exp. Biol. Vol. 42, Cambridge, The Company of Biologists Limited, pp. 237-258.
- Quiroz-Figueroa, F., Mendez-Zeel, M., Larque-Saavedra, A., Loyola-Vargas, V. M. (2001) Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Rep.* 20: 679-684.
- Rajasekaran, L.R., Stiles, A., Caldwell, C.D. (2002) Stand establishment in processing carrots- Effects of various temperature regimes on germination and the role of salicylates in promoting germination at low temperatures. *Can. J. Plant Sci.* 82: 443-450.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., Watkins, C.B. (1997) Influence of salicylic acid on  $H_2O_2$  production, oxidative stress, and  $H_2O_2$ -metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 115: 137-149.
- Rao, M.V., Davis, K.R. (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J.* 17: 603-614.
- Rao, M.V., Lee, H.I., Creelman, R.A., Mullet, J.E., Davis, K.R. (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12: 1633-1646.
- Rao, M.V., Lee, H., Davis, K.R. (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.* 32: 447-456.
- Raskin, I., Ehmann, A., Melander, W.R., Meeuse, B.J.D. (1987) Salicylic acid: a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* 237: 1601-1602.
- Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463.
- Rhoads, D.M., McIntosh, L. (1992) Cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. Effects of salicylic acid. *Plant Physiol.* 103: 877-883.
- Roman, M., Ducruet, J.-M. (2000) Evidence from leaf thermoluminescence for a decrease of the [NADPH + ATP] energetic potential in cold-sensitive *Pisum sativum* L. varieties upon hardening at 5 °C. *J. Plant Physiol.* 157: 177-181.
- Rüffer, M., Steipe, B., Zenk, M.H. (1995) Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Lett.* 377: 175-180.
- Sahu, G.K., Kar, M., Sabat, S.C. (2002) Electron transport activities of isolated thylakoids from wheat plants grown in salicylic acid. *Plant Biol.* 4: 321-328.
- Sánchez-Casas, P., Klessig, D.F. (1994) A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.* 106: 1675-1679.
- Sánchez-Díaz, M., Pérez de Juan J., Irigoyen, J.J. (1993) The effect of chilling on stomatal behaviour, transpiration, water absorption and carbon dioxide exchange rate in drought-hardened and non hardened maize (*Zea mays* L.). In: Wilson D, Thomas H, Pithan K (eds.) *Crop adaptation to cool, wet, climates*. E GUYOT SA, Brussels, pp 245-250.
- Sane, P.V., Rutherford, A.W. (1986) Thermoluminescence from photosynthetic membranes. In: Govindjee, Ames, J. and Fork, D.C. (eds.) *Light Emission by Plants and Bacteria*. Academic Press, New York, pp. 329-360.
- Sawada, H., Shim, I.S., Usui, K. (2006) Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis - Modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Sci.* 171: 263-270.
- Scandalios, J.G., Guan, L., Polidoros, A.N. (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. In: Scandalios, J.G. (ed.) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. pp. 343-406.
- Scandalios, J.G., Acevedo, A., Ruzsa, S. (2000) Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. *Plant Sci.* 156: 103-110.

- Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C. (1998) Changes in activity of antioxidant enzymes in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under cold acclimation. *Physiol. Plant.* 104: 747-752.
- Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C. (1999) Protective enzymes against oxygen species in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings: responses to cold acclimation, *J. Plant Physiol.* 155: 762-768.
- Schreiber, U., Berry, J.A. (1977) Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of photosynthetic apparatus. *Planta* 136: 233-238.
- Schreiber U., Klughammer C., Neubauer C. (1988) Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. *Z. Naturforsch.* 43c: 686-698.
- Scott, I.M., Clarke, S.M., Wood, J.E., Mur, L.A.J. (2004) Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135: 1040-1049.
- Selye, H. (1936) A Syndrome Produced by Diverse Noxious Agents. *Nature* 138: 32-45.
- Selye, J. (1978) Életünk és a stress. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K. (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30: 157-161.
- Senaratna, T., Merritt, D., Dixon, K., Bunn, E., Touchell, D., Sivasithamparam, K. (2003) Benzoic acid may act as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants. *Plant Growth Regul.* 39: 77-81.
- Shah, J., Klessig, D.F. (1999) Salicylic acid: signal perception and transduction. In: Hooykaas, P.P.J., Hall, M.A., Libbenga, K.R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands 513-541.
- Shakirova, F.M., Sakhabutdinova, A.R., Bezrukova, M.V., Fatkhutdinova, R.A., Fatkhutdinova, D.R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164: 317-322.
- Sharma, Y.K., León, J., Raskin, I., Davis, K.R. (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5099-5104.
- Shen, Y., Tang, M.J., Hu, Y.L., Lin, Z.P. (2004) Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Sci.* 166: 1167-1175.
- Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., Ying, Q., Qian, Q. (2006) Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regul.* 48: 127-135.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53: 1305-1319.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410-417.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Métraux, J.-P., Raskin, I. (1995) Salicylic acid in rice: biosynthesis, conjugation, and possible role. *Plant Physiol.* 108: 633-639.
- Singh, B., Usha, K. (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regul.* 39: 137-141.
- Singh, D.P., Moore, C.A., Gilliland, A., Carr, J.P. (2004) Activation of multiple antiviral defense mechanisms by salicylic acid. *Mol. Plant Pathol.* 5: 57-63.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175: 408-413.

- Solecka, D., Kacperska, A. (2003) Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiol. Plant.* 119: 253-262.
- Sonoike, K. (1996) Photoinhibition of photosystem I: Its physiological significance in the chilling sensitivity of plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 239-247.
- Stallaert, V.M., Ducruet, J.-M., Tavernier, E., Blein, J.-P. (1995) Lipid peroxidation in tobacco leaves treated with the elicitor cryptogein: evaluation by high-temperature thermoluminescence emission and chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 1229: 290-295.
- Steiglitz K. E., McBride L.E. (1965) A technique for the identification of linear systems. *IEEE Trans. Autom. Control* AC-10, 461-464.
- Stevens, J., Senaratna, T., Sivasithamparan, K. (2006) Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regul.* 49: 77-83.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1997) *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035-1040.
- Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardeström, P., Stitt, M. (1999) Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperature. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol.* 119: 1387-1398.
- Streb, P., Shang, W., Feierabend, J. (1999) Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photo-oxidative stress, *Plant Cell Environ.* 22: 1211-1223.
- Strobel, N.E., Kuc, A. (1995) Chemical and biological inducers of systemic acquired resistance to pathogens protect cucumber and tobacco from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathol.* 85: 1306-1310.
- Sundblad, L.G. (1988) Dark reduction of  $Q_A$  in intact leaves as an effect of lower  $CO_2$  concentration monitored by chlorophyll *a* luminescence and chlorophyll *a*  $F_0$  dark fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 973: 47-52.
- Sutka, J. (1981) Genetic studies of frost resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 59: 145-152.
- Sutka, J. (1994) Genetic control of frost resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 77: 277-282.
- Suzuki, N., Mittler, R. (2006) Reactive oxygen species and temperature stress: A delicate balance between signalling and destruction. *Physiol. Plant.* 126: 45-51.
- Sveshnikov, D., Ensminger, I., Ivanov, A.G., Campbell, D., Lloyd, J., Funk, C., Hüner, N.P.A., Öquist, G. (2006) Excitation energy partitioning and quenching during cold acclimation in Scots pine. *Tree Physiol.* 26: 325-336.
- Szalai, G., Janda, T., Páldi, E., Szigeti, Z. (1996) Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *J. Plant Physiol.* 148: 378-383.
- Szalai, G. (1997a) Alacsony hőmérséklet és a megvilágítás hatásai egyes anyagcsere folyamatokra a kukorica korai fejlődési stádiumában. PhD értekezés, ELTE TTK.
- Szalai, G., Janda, T., Bartók, T., Páldi, E. (1997b) Role of light in changes in free amino acid and polyamine contents at chilling temperature in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.* 101: 434-438.
- Szalai, G., Janda, T., Bencze, S., Harnos, N., Veisz, O., Páldi, E. (1999) Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat plants during frost hardening. In: M. Sanchez-Diaz, J.J. Irigoyen, J. Aguirreolea, K. Pithan, (eds.), *Crop Development for Cool and Wet Climate of Europe*, EC, Brussels, Belgium, pp. 368-375.

- Szalai, G., Tari, I., Janda, T., Pestencz, A., Pldi, E. (2000) Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. *Biol. Plant.* 43: 637-640.
- Szalai, G., Janda, T., Pldi, E., Dubacq, J.-P. (2001) Changes in the fatty acid unsaturation after hardening in wheat chromosome substitution lines with different cold tolerance. *J. Plant Physiol.* 158: 663-666.
- Szalai, G., Pl, M., Horváth, E., Janda, T., Pldi, E. (2005) Investigations on the adaptability of maize lines and hybrids to low temperature and cadmium. *Acta Agron. Hung.* 53: 183-196.
- Takc, T., Luxov, M., Gašparkov, O. (2003) Cold induced changes in antioxidant enzymes activity in roots and leaves of two maize cultivars. *Biologia, Bratislava* 58: 875-880.
- Tasgn, E., Atc, ., Nalbantoglu, B. (2003) Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regul.* 41: 231-236.
- Tasgn, E., Atc, ., Nalbantoglu, B., Popova, L.P. (2006) Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochem* 67: 710-715.
- Teixeira, F.K., Menezes-Benavente, L., Margis, R., Margis-Pinheiro, M.J. (2004) Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Mol. Evol.* 59: 761-770.
- Thomashow, M.F. (1998) Role of cold-responsive gene in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1-7.
- Thomashow, M.F. (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol.* 125: 89-93.
- Tsaftaris, A.S., Bosabalidis, A.M., Scandalios, J.G. (1983) Cell-type-specific gene expression and acatalasemic peroxisomes in a null *Cat2* catalase mutant of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5549-5553.
- Vágújfalvi, A., Kerepesi, I., Galiba, G., Tischner, T., Sutka, J. (1999) Frost hardiness depending carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. *Plant Sci.* 144: 85-92.
- Vágújfalvi, A., Galiba, G., Cattivelli, L., Dubcovsky, J. (2003) The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-tolerance gene *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Mol. Gen. Genom.* 269: 60-67.
- Vágújfalvi, A., Aprila, A., Miller, A., Dubcovsky, J., Delugu, G., Galiba, G., Cattivelli, L., (2005) The expression of several *Cbf* genes at the *Fr-A2* locus linked to frost resistance in wheat. *Mol. Gen. Genom.* 274: 506-514.
- Van Buskirk, H.A., Thomashow, M.F. (2006) *Arabidopsis* transcriptional factors regulating cold acclimation. *Physiol. Plant.* 126: 72-80.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Inz, D. (1998) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 3: 330-334.
- Van der Straeten, D., Chaerle, L., Sharkov, G., Lambers, H., Van Montagu, M. (1995) Salicylic-acid enhances the activity of the alternative pathway of respiration in tobacco-leaves and induces thermogenicity. *Planta* 196: 412-419.
- Vandenabeele, S., Van Ser Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefaes, T., Morsa, S., Rottiers, P., Slotten, L., Van Montagu, M., Zabeau, M., Inz, D., Van Breusegem, F. (2003) A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 16113-16118.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inz, D., Van Breusegem, F. (2005) Catalase deficiency drastically affects gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol.* 139: 806-821.



- Vandeventer, H. A. (1985) Cyanide-resistant respiration and cold resistance in seedlings of maize (*Zea mays* L.). *Ann. Bot.* 56: 561-563.
- van Kooten, O., Snel, J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25: 147-150.
- van Wees, S.C.M., Glazebrook, J. (2003) Loss of non-host resistance of *Arabidopsis* NahG to *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J.* 33: 733-742.
- Vass, I., Horváth, G., Herczeg, T., Demeter, S. (1980) Determination of activation energies and half-lives of thermoluminescence bands of chloroplasts applying the method of multicomponent curve resolution. *FEBS Lett.* 116: 293-297.
- Vass, I., Horváth, G., Herczeg, T., Demeter, S. (1981) Photosynthetic energy conversion investigated by thermoluminescence. Activation energies and half-lives of thermoluminescence bands of chloroplasts determined by mathematical resolution of glow curves. *Biochim. Biophys. Acta* 634: 140-152.
- Vass, I., Styring, S., Hundall, T., Koivuniemi, A., Aro E.-M., Andersson, B. (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduced Q<sub>A</sub> species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 1408-1412.
- Vass, I., Inoue, Y. (1992) Thermoluminescence in the study of photosystem II. . In: Barber, J. (ed.) *Topics in Photosynthesis, Vol. 11, The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*, Elsevier, Amsterdam, pp. 259-294.
- Vass, I., Govindjee (1996) Thermoluminescence from the photosynthetic apparatus. *Photosynth. Res.* 48: 117-126.
- Vavilin, D.V., Ducruet, J.-M. (1998) The origin of 115-130°C thermoluminescence bands in chlorophyll-containing material. *Photochem. Photobiol.* 68: 191-198.
- Vavilin, D.V., Ducruet, J.-M., Matorin, D.N., Venediktov, P.S., Rubin, A.B. (1998) Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem I activity in green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *J. Photochem. Photobiol. B.* 42: 233-239.
- Veisz, O. (1989) A megvilágítás hosszának és spektrális összetételének hatása az őszi búza fagyállóságára. *Növénytermelés* 38: 105-110.
- Veisz, O., Sutka, J. (1989) The relationship of hardening period and the expression of frost resistance in chromosome substitution lines of wheat. *Euphytica* 43: 41-45.
- Veisz, O., Bedő, Z., Láng, L., Sutka, J., Tischner, T. (1997) Reversal dominance in wheat frost resistance as a function of the freezing temperature. *J. Genet. Breed.* 51: 289-294.
- Veisz, O., Bencze, Sz., Janda, T., Páldi, E., Bedő, Z. (2004) Changes in the activity of antioxidant enzymes in cereal species during the winter. *Cereal Res. Comm.* 32: 493-500.
- Venediktov, P.S., Matorin, D.N., Kafarov, R.S. (1989) Chemiluminescence of chlorophyll upon lipid peroxidation in thylakoid membranes. *Biofizika* 34: 241-245 [oroszul].
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6: 959-965.
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., Thomashow, M.F. (2005) Roles of CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.* 41: 195-211.
- Wada, H., Gombos, Z., Murata, N. (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* 347: 200-203.
- Wang, Y.Y., Mopper, S., Hasenstein, K.H. (2001) Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *J. Chem. Ecol.* 27: 327-342.

- Wang, L.J., Li, S.H. (2006) Thermotolerance and related antioxidant enzyme activities induced by heat acclimation and salicylic acid in grape (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Plant Growth Regul.* 48: 137-144.
- Wasternack, C., Atzorn, R., Jarosch, B., Kogel, K.H. (1994) Induction of a thionin, the jasmonate-induced 6 kDa protein of barley by 2,6,-dichloroisonicotinic acid. *J. Phytopathol.* 140: 280-284.
- Watahiki, M.K., Mori, H., Yamamoto, K.T. (1995) Inhibitory effects of auxins and related substances on the activity of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase isozyme expressed in *Escherichia coli*. *Physiol. Plant.* 94: 566-574.
- Wildermuth, M. C. Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F. M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562–565.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schaudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816.
- White, R.F. (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412.
- Wohlgemuth, H., Mittelstrass, K., Kschieschan, S., Bender, J., Weigel, H.J., Overmyer, K., Kangasjarvi, J., Sandermann, H., Langebartels, C. (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ.* 25: 717-726.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M.A., Kleier, D.A., Raskin I. (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3: 809-818.
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. A., Raskin, I. (1993) Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 315–321.
- Yalpani, N., Enyedi, A.J., Leon, J., Raskin, I. (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193: 372-376.
- Yordanova, R.Y., Christov, K.N., Popova, L.P. (2004) Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. Exp. Bot.* 51: 93-101.
- Yoshida, R., Kanno, A., Sato, T., Kameya, T. (1996) Cool-temperature-induced chlorosis in rice plants. *Plant Physiol.* 110: 997-1005.
- Yu, D., Liu, Y., Fan, B., Klessig, D.F., Chen, Z. (1997) Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiol.* 115: 343-349.
- Zchut, S., Keren, N., Ohad, I., Pick, U. (2003) Cold-acclimation protects photosystem II against freezing damage in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *J. Plant Physiol.* 160: 185-192.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete vezetőségének azért, hogy mindvégig megfelelő háttérrel biztosítottak a munkám elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom elsősorban a Növényi Stresszélettani csoportban dolgozó jelenlegi és egykori közvetlen munkatársaimnak, Dr. Páldi Emilnek, Dr. Szalai Gabriellának, Kövesdi Ferencnének, Kóti Gyulánénak, Dr. Horváth Eszternek, Dr. Leskó Kornéliának, Pál Magdának, akik nagyban hozzájárultak az értekezésben bemutatott kísérletek végrehajtásához., ill. a Genetika és Növényélettani Osztály többi munkatársai közül elsősorban Dr. Galiba Gábornak és Dr. Kocsy Gábornak a hasznos tanácsaikért.

Ismételten külön köszönettel tartozom Dr. Demeter Sándornak (SZBK, Növénybiológiai Intézet), aki annak idején bevezetett a tudományos kutatás rejtelmeibe. Köszönöm továbbá Dr. Szigeti Zoltánnak (ELTE, Növényélettani Tanszék), hogy mindvégig vállalkozott a felmerülő problémák megvitatására.

Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Jean-Marc Ducruet-nek, a saclay-i CEA Section de Bioénergétique intézet munkatársának a több, mint egy évtizede tartó gyümölcsöző együttműködésért. Külön köszönöm Dr. Micha Volokitának az izraeli Ben Gurion University kutatójának, hogy megismertetett a legfontosabb molekuláris genetikai módszerekkel.

Köszönöm továbbá valamennyi hazai és külföldi kollégának a korrekt és sikeres együttműködést, amely nagymértékben hozzájárult eredményeink eléréséhez.

A dolgozatban leírt munka számos egyéb anyagi forrás mellett nagyrészt a T32653, T46150 sz. OTKA pályázatok támogatásával készült.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni mindazon környezetemben élők türelmét, akikre a kísérletes munka, ill. a dolgozat készítése miatt esetleg nem mindig tudtam annyi figyelmet szentelni, amennyit megérdemeltek volna.